

Die Rolle des Epstein-Barr Virus in der Lymphompathogenese

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs
Biologie und Geografie

an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Dörte Siemer

aus Warendorf

02.09.08

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) des Universitätsklinikums Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Küppers

2. Gutachter: Prof. Dr. Bernhard Horsthemke

Vorsitzende des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. Ann Ehrenhofer-Murray

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.09

Meiner Familie

Verzeichnis der Abkürzungen

AID	Aktivierungs-induzierte Cytidin Deaminase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Allophycocyanin
ASH	Aberrante somatische Hypermutation
BC	Leukozyten-angereichertes Blut-Präparat (engl. <u>b</u> uffy <u>c</u> oat)
BCL-6	B-Zell-Lymphom Antigen 6
BCR	B-Zell-Rezeptor (engl. <u>B</u> <u>c</u> ell <u>r</u> eceptor)
bp	Basenpaar
BL	Burkitt-Lymphom
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <u>b</u> ovine <u>s</u> erum <u>a</u> lbumin)
C	konstante Region der Ig Ketten (engl. Ig <u>c</u> onstant region)
CD	Differenzierungscluster (engl. <u>c</u> luster of <u>d</u> ifferentiation)
CDR	Komplementaritäts-bestimmende Region (engl. <u>c</u> omplementarity <u>d</u> etermining <u>r</u> egion)
CTAR	C-terminale Aktivierungs-Region
DH	Diversitäts-Gensegment der Immunoglobulin schweren Kette (engl. <u>d</u> iversity region of Ig <u>h</u> eavy chain)
DLBCL	Diffus-grosszelliges B-Zell-Lymphom
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. deoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
dNTPs	Deoxy-Nukleosid-Triphosphate
EBER	EBV-kodierte RNA (engl. <u>E</u> BV- <u>e</u> ncoded <u>R</u> NA)
EBF	früher B-Zell-Faktor (engl. <u>e</u> arly <u>B</u> cell <u>f</u> actor)
EBV	Epstein-Barr Virus
et al.	und andere (lat. <u>e</u> t <u>a</u> ltera)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FDC	Follikulär dendritische Zellen (engl. <u>f</u> ollicular <u>d</u> endritic <u>c</u> ells)
FCS	fötales Kälberserum (engl. <u>f</u> etal <u>c</u> alf <u>s</u> erum)
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FR	Gerüstregion(en) der AK (engl. <u>f</u> ramework <u>r</u> egion)
GATA3	GATA-bindendes Protein 3
GC	Keimzentrum (engl. <u>g</u> erminal <u>c</u> enter)
H	Ig-schwere Kette (engl. <u>h</u> eavy chain)
HIV	Humanes-Immundefizienz-Virus
HL	Hodgkin-Lymphom
HRS	Hodgkin and Reed/Sternberg
Ig	Immunglobulin

IL	Interleukin
IM	Infektiöse Mononukleose
ISH	In-Situ-Hybridisierung
IVT	In-Vitro-Transkription
J	Verbindungs-Gensegment der Ig-Ketten (engl. <u>j</u> oining <u>r</u> egion)
κ	Ig-Kappa
kb	Kilobasen
KDE	Kappa zerstörendes Element (engl. <u>k</u> appa <u>d</u> eleting <u>e</u> lement)
KW	Klassenwechsel
λ	Ig-Lambda
L	Ig-leichte Kette (Lambda oder Kappa)
LCL	lymphoblastoide Zelllinie (engl. <u>l</u> ymphoblastoid <u>c</u> ell <u>l</u> ine)
LD	limitierende Verdünnung (engl. <u>l</u> imiting <u>d</u> ilution)
LDI-PCR	Weitreichende inverse PCR (engl. <u>l</u> ong <u>d</u> istance <u>i</u> nverse PCR)
LMP	Latentes Membranprotein
MACS	magnetisch-aktivierte Zellsortierung
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität (engl. <u>m</u> ean fluorescent <u>i</u> ntensity)
MHC	Hapthistokompatibilitätskomplex (engl. <u>m</u> ajor <u>h</u> istocompatibility <u>c</u> omplex)
miR	Mikro-RNA
PB	Peripheres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem PB (engl. <u>PB</u> <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl. <u>p</u> hosphate- <u>b</u> uffered <u>s</u> aline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction)
PE	Phycoerythrin
PTLD	Posttransplantations-lymphoproliferative Erkrankung (engl. <u>p</u> ost <u>t</u> ransplant <u>l</u> ymphoproliferative <u>d</u> isease)
RNA	Ribonukleinsäure (engl. <u>r</u> ibon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription-PCR
sIg	Oberflächen-Ig (engl. <u>s</u> urface Ig)
SYK	Milz-Tyrosin-Kinase (engl. <u>S</u> pleen Tyrosine (<u>Y</u>) <u>K</u> inase)
Taq Pol	DNA-Polymerase des Thermus aquaticus Bakteriums
TF	Transkriptionsfaktor/-en
TMC	Tonsilläre mononukleäre Zellen (engl. <u>t</u> onsillar <u>m</u> ononuclear <u>c</u> ells)
V	Variables Gensegment der Ig-Ketten
V _H L	Variables Gensegment des IgH inklusive der Leitpeptidregion
Vol	Volumen

Inhaltsangabe

1. Einleitung	4
1.1 B-Zell-Immunologie	4
1.1.1 Grundzüge des Immunsystems	4
1.1.2 Die B-Zellentwicklung	5
1.1.3 Das BCR-Signal	8
1.1.4 Die Keimzentrumsreaktion	8
1.2 Das Epstein-Barr Virus	12
1.2.1 Infektion und Persistenz	12
1.2.2 Latente Genprodukte	15
1.3 EBV-assoziierte GC-B-Zell-Lymphome	19
1.3.1 Das Burkitt Lymphom	21
1.3.2 Das Hodgkin Lymphom	21
1.3.3 Post-Transplantations-lymphoproliferative Erkrankungen	23
1.4 Zielsetzung der Arbeit	25
2. Material und Methoden	26
2.1 Isolierung von BCR-defizienten GC- und naiven B-Zellen	26
2.2 In-Vitro-Infektion mit EBV und Etablierung von GC- und N-LCLs	26
2.3 Herstellung autologer Fütterzellen	27
2.4 Zellkultur	27
2.5 PCR-Analysen	28
2.5.1 V-Gen-PCR	28
2.5.2 V-Gen- und EBNA1-Einzelzell-PCR	29
2.5.3 D _H -PCR	31
2.5.4 LDI-PCR	32
2.5.5 EBV-PCR	33
2.6 Klonierung von V _H -PCR-Produkten und Analyse von V _H -Genmutationen	34
2.6.1 A-Anhang	35
2.6.2 Ligation	35
2.6.3 Transformation	35
2.7 Sequenzanalyse	35
2.8 Immunfärbungen	36
2.8.1 Fluoreszenz-Färbungen auf Zytozentrifugationspräparaten	36

2.8.2	FACS-Färbungen	37
2.8.2.1	Oberflächen-Ig-Färbung	37
2.8.2.2	Einfach- und Zweifach-Färbungen	37
2.9	Quantitative RT-PCR	39
2.10	Western-Blot-Analysen	39
2.11	Isolierung EBV ⁺ B-Zellen aus dem PB gesunder Spender	40
2.11.1	EBER-ISH	41
2.11.2	AP-Immunfärbung	41
2.11.3	Herstellung der EBER-Sonde durch In-Vitro-Transkription	41
2.11.3.1	Amplifikation der EBER-Gene	42
2.11.3.2	In-Vitro-Transkription und ISH	43
2.11.4	Einzelzell-Mikrodissektion	43
2.11.4.1	Hydraulische Mikrodissektion	43
2.11.4.2	Laser-Mikrodissektion	44
3.	Ergebnisse	45
3.1	Etablierung BCR-defizienter GC-LCLs	45
3.1.1	EBV-Infektion von GC-B-Zellen und Einzelzellklonierung	46
3.1.2	Analyse der Klonalität der Linien	46
3.1.3	Screen auf Oberflächenrezeptornegativität	49
3.1.4	Mutationsanalyse und Suche nach BCR-destruktiven Mutationen	51
3.1.5	Quantitative Analyse der Ig-Transkription	55
3.2	Etablierung von LCLs aus naiven B-Zellen	58
3.2.1	Aufreinigung und EBV-Infektion der naiven B-Zellen aus dem PB	58
3.2.2	Validierung der Naivität der isolierten Zellen	58
3.2.3	Analyse der Klonalität der N-LCLs und Mutationsanalyse	59
3.3	Phänotypische Analyse der monoklonalen GC- und N-LCLs	60
3.4	Der Einfluss von EBV auf die SHM	66
3.5	Etablierung einer Methode zur Aufreinigung EBV ⁺ B-Zellen aus dem PB gesunder Blutspender	68
3.5.1	Protokoll-Varianten	69
3.5.2	Charakterisierung EBV ⁺ B-Zellen aus dem PB drei gesunder Spender	72

4. Diskussion	75
4.1 Rettung BCR-loser GC-B-Zellen durch EBV demonstriert erstmals die essentielle Funktion des Virus in der frühen HL- und PTLD-Pathogenese	75
4.2 Einfluss von EBV auf GC- und naive B-Zellen	78
4.3 GC-LCLs als In-Vitro-Modelle der HL- und PTLD-Pathogenese	81
4.4 EBV Latenz III inhibiert die Aktivität der SHM in GC-B-Zellen	83
4.5 Vorstellung einer verlässlichen Methode zur Aufreinigung seltener EBV ⁺ B-Zellen aus dem PB	86
4.6 Ausblick	89
5. Zusammenfassung	91
6. Literaturverzeichnis	93
7. Anhang	116
8. Danksagung	

1. Einleitung

1.1 B-Zell-Immunologie

1.1.1 Grundzüge des Immunsystems

Das menschliche Immunsystem trägt die Aufgabe, den Organismus vor einer Vielzahl von Pathogenen zu schützen, sie zu identifizieren und zu eliminieren. Während einer Infektion werden Pathogene durch die Aktivierung und das Zusammenspiel der angeborenen und der adaptiven Immunantwort effektiv vernichtet. Zellen der angeborenen Immunantwort wie z.B. Makrophagen, dendritische Zellen und Granulozyten tragen in der Keimbahn-kodierte, unveränderliche Rezeptoren, die molekulare Muster der Pathogene erkennen (Janeway und Medzhitov, 2002). Zu diesen molekularen Mustern gehören z.B. Lipopolysaccharide, Mannane, Flagelline sowie virale und bakterielle Nukleinsäuren. Die Aktivierung dieser Muster-erkennenden Rezeptoren (engl. Pattern recognition receptors), zu denen auch die Toll-ähnlichen Rezeptoren gehören, kann eine Vielzahl von Reaktionen auslösen, die zur Vernichtung der Pathogene beitragen (Brown et al., 2007; Kanzler et al., 2007). Zelltyp-spezifisch gehören zu diesen Reaktionen Zelldifferenzierung, Zellproliferation, Phagozytose, Apoptose sowie die Aktivierung von Interferonen (IFN) und Interleukinen (IL). Auf diese Weise erfüllt die Aktivierung der angeborenen Immunantwort die Funktionen der Pathogenerkennung, sofortigen Antipathogen-Antwort und der Stimulierung und Rekrutierung des adaptiven Immunsystems (Kanzler et al., 2007).

Als ein weiterer Bestandteil des angeborenen Immunsystems trägt das Komplementsystem erheblich zur Eliminierung von Pathogenen bei. Das Komplementsystem besteht aus löslichen und zellulären Proteinen, die nach Antigenerkennung eine Kaskade von Protein-Protein Wechselwirkungen auslösen, die schliesslich zur Zelllyse bzw. zur Opsonisierung der Pathogene führt. Der klassische Komplementweg wird durch Immunoglobulinkomplexe ausgelöst und ist somit an der adaptiven Immunantwort stark beteiligt. Das angeborene Immunsystem sorgt für eine schnelle jedoch relativ unspezifische und transiente Pathogen-Eliminierung. Adaptive Immunantworten hingegen entwickeln sich langsamer, sind aber sehr spezifisch, lang-andauernd und bilden ein Gedächtnis, so dass bei erneuter Infektion mit dem gleichen Erreger dieser sehr schnell eliminiert werden kann. Zudem kann das adaptive Immunsystem auch auf Krankheitserreger mit neuen molekularen Mustern reagieren.

Die Zellen des adaptiven Immunsystems, hauptsächlich B- und T-Zellen, tragen veränderliche Rezeptoren, die T-Zell- und B-Zell-Rezeptoren (engl. B cell receptor, BCR) die nicht in der Keimbahnsequenz kodiert sind, sondern durch Genumordnungen und klonale Selektion im Verlauf der B- und T-Zellentwicklung im Knochenmark bzw. im

Thymus erworben werden (Rajewsky, 1996). Die Hauptaufgabe der B-Zellen besteht in der Bildung von Antikörpern (AK) und in der Präsentation von prozessierten Antigenen an T-Zellen. T-Zellen können über ihre T-Zell Rezeptoren prozessierte und auf MHC I- und MHC II-Komplexen (engl. major histocompatibility complex, MHC) präsentierte Antigene binden. Bei der MHC II-Antigen-Präsentation spielen spezielle Antigen-präsentierende Zellen, hauptsächlich B-Zellen und dendritische Zellen, eine maßgebliche Rolle. Die Antigen-präsentierenden Zellen binden, internalisieren und prozessieren Antigene, um sie dann auf den MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche den T-Zellen zu präsentieren.

Die Aktivierung der T-Zellen kann einerseits zur Eliminierung der infizierten Zelle (zytotoxische T-Zellen) oder zur Ausschüttung von Botenstoffen (T-Helferzelle) und direkten Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen führen. Diese Interaktion führt z.B. zu einer T-Zell-abhängigen Immunantwort und somit zur Bildung von langlebigen Plasma- und Gedächtnis-B-Zellen, die hochaffine AK sezernieren bzw. als Teil des BCR auf der Oberfläche exprimieren. Eine Bindung dieser hochaffinen AK an das Antigen führt zur Aktivierung von Effektorzellen und somit zur raschen Eliminierung des Pathogens bei erneuter Infektion (MacLennan, 1994).

1.1.2 Die B-Zellentwicklung

Die Hauptaufgabe der B-Zellen ist die Bildung von AK im Rahmen einer Immunantwort. Bei der Entwicklung der Zellen im Knochenmark werden die AK-kodierenden Gene sequenziell rekombiniert und auf ihre Funktionalität getestet. AK können gemeinsam mit den Signal-sendenden Immunoglobulin- (Ig) Molekülen $Ig\alpha$ und $Ig\beta$ als Teil des BCR auf der Oberfläche exprimiert oder durch alternatives Spleissen als lösliches Protein sezerniert werden. B-Zellen sind stets von einem tonischen Überlebenssignal des BCR abhängig und sterben ohne BCR durch Apoptose (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997).

AK bestehen aus zwei identischen schweren (engl. heavy chain, H) und zwei identischen leichten (engl. light chain, L) Polypeptidketten (Abb. 1). Die schweren und leichten Ketten tragen aminoterminal variable (engl. variable region, V) und carboxyterminale konstante (engl. constant region, C) Regionen. Die C-Regionen bestehen beim Menschen entweder aus einem C_{μ} -, einem C_{δ} -, einem der zwei C_{α} -, einem C_{ϵ} - oder einem der vier C_{γ} -Gene und machen den Isotyp des BCR aus. Die Isotypen sorgen für unterschiedliche Effektorfunktionen. Die Ausprägung eines bestimmten Isotyps ist abhängig von den unterschiedlichen Pathogenen und den verschiedenen B-Zell-Entwicklungsstadien.

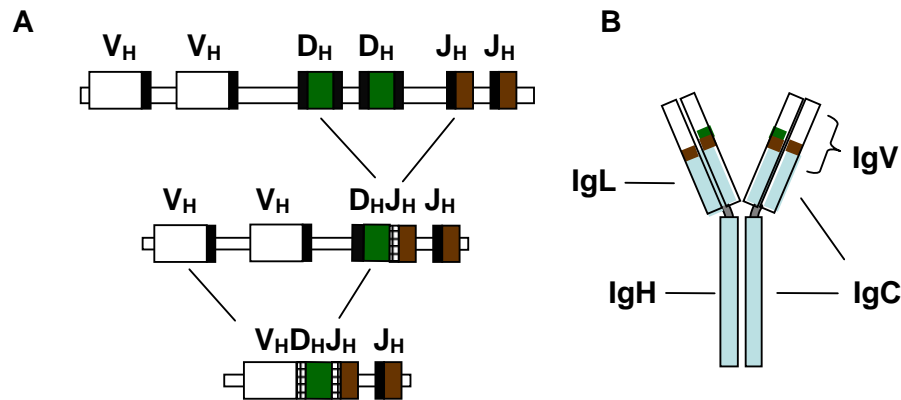


Abb. 1: Schematische Darstellung der $V_H D_H J_H$ -Genrekombination (A) und des AK-Moleküls (B). Weisse Balken entsprechen den V_H -Genen (A) bzw. den V_H -Proteinteilen (B); grüne Balken entsprechen den D_H -Genen (A) bzw. den D_H -Proteinteilen (B); braune Balken entsprechen den J_H -Genen (A) bzw. den J_H -Proteinteilen (B); die schraffierten Bereiche der $V_H D_H J_H$ -Genverbindung deuten auf die nicht-Keimbahn-kodierten N-Nukleotide hin.

Die Gene der V-Regionen der AK kodieren für drei hypervariable (engl. complementary determining region, CDR) und vier Gerüstregionen (engl. framework region, FR). Die V_H -Regionen bestehen aus variablen (engl. variable, V), Diversitäts- (engl. diversity, D) und Verbindungs- (engl. joining, J) Gensegmenten. Die V_L -Regionen der entweder Kappa (κ) oder Lambda (λ) leichten Ketten bestehen aus V- und J-Gensegmenten. Beim Menschen existieren in der Keimbahnkonstellation etwa 50 kodierende V_H - (Matsuda und Honjo, 1996), 27 D_H - (Corbett et al., 1997) und 6 J_H - (Ravetch et al., 1981), 40 funktionelle V_κ - (Tomlinson et al., 1995) und 5 J_κ - (Hieter et al., 1982) sowie 30 funktionelle V_λ - (Williams et al., 1996) und 4 J_λ - (Vasicek und Leder, 1990) Gene. Die somatische Rekombination jeweils eines Genes dieser Gensegmente findet im Knochenmark statt und führt zu $V_H D_H J_H$ - bzw. zu $V_L J_L$ -Genverbindungen (Abb. 1). Die RAG1- und RAG2-Enzyme (engl. recombination activating genes 1 and 2) leiten diesen Rekombinationsprozess ein, indem sie die Rekombinations-Signal-Sequenzen (engl. recombination signal sequence, RSS), von der jedes Gen der V-Regionen flankiert wird, erkennen (Janeway, 1997). Im Entwicklungsstadium der Pro-B-Zelle wird zuerst die $D_H J_H$ -Rekombination des Schwereketten-Lokus vollzogen und anschließend ein V_H -Gen and die vorhandene $D_H J_H$ -Genverbindung rekombiniert (Blackwell und Alt, 1984; Rajewsky, 1996).

Die Rekombination der AK-Gene kann zum Verlust von 1-4 Nukleotiden und zum Einbau einer zufälligen Anzahl nicht-Keimbahn-kodierter Nukleotide (N-Nukleotide) durch das Enzym Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase in der CDR III-Region führen. Dies führt in ca. 2/3 der Fälle zu einer Verschiebung des Leserasters. In diesem Fall kann kein funktionelles Protein mehr entstehen. Hat eine solche unproduktive Genumlagerung

stattgefunden, kann die Rekombination auf dem zweiten Schwerketten-Lokus eingeleitet werden (Feddersen und Van Ness, 1985; Rajewsky, 1996; Tiegs et al., 1993). Zellen, die nach erneuter Genumlagerung keinen funktionellen BCR ausprägen können, sterben durch Apoptose (Rajewsky, 1996). Hat die $V_H D_H J_H$ -Genumlagerung zu einer funktionellen Genverbindung geführt, werden keine weiteren V_H -Genumlagerungen vorgenommen (allelischer Ausschluss), die Prä-B-Zelle teilt sich und es kommt zu einer klonalen Expansion. Im Anschluss an die Zellproliferation wird die Rekombination der Gene der leichten Ketten eingeleitet. Diese erfolgt zunächst auf dem κ -Lokus (Bräuninger et al., 2001; Rajewsky, 1996). Erst wenn auf beiden κ -Allelen unproduktive κ -Genumlagerungen stattgefunden haben, wird der λ -Lokus rekombiniert. Eine B-Zelle exprimiert entweder κ - oder λ -leichte Ketten (Isotypenausschluss) (Alt et al., 1992; Tonegawa, 1983). Die Rekombination des λ -Lokus erfolgt in der Regel erst dann, wenn der κ -Lokus durch das κ -deletierende Element (engl. kappa-deleting element, KDE) inaktiviert worden ist (Bräuninger et al., 2001; Vela et al., 2008). Sobald eine B-Zelle eine funktionelle, nicht-autoreaktive schwere und leichte Kette ausprägt, kann sie das Knochenmark als Antigen-unerfahrene „naive“ IgM^+ und IgD^+ B-Zelle in die Peripherie verlassen (Rajewsky, 1996). B-Zellen mit autoreaktiven BCR können entweder sekundäre Rekombinationsprozesse (engl. Receptor Editing), die zu einem funktionellen, nicht-autoreaktiven BCR führen können, einleiten oder durch Anergie unschädlich gemacht werden (Goodnow et al., 1988; Pelanda et al., 1997; Retter und Nemazee, 1998; Tiegs et al., 1993).

Die Rekombination der verschiedenen V_H -, D_H -, J_H - und V_L -, J_L -Gensegmente und der Verlust bzw. der zufällige Einbau von nicht-Keimbahn-kodierten Nukleotiden innerhalb der CDR III-Regionen sowie die Verbindung verschiedener schwerer und leichter Ketten miteinander sorgt für eine mögliche Diversität der AK von bis zu 10^{14} verschiedenen Molekülen (Sanz, 1991). Auf diesem Weg ist gewährleistet, dass jede B-Zelle, die das Knochenmark verlässt und in die Peripherie abwandert, einen einzigartigen BCR exprimiert. Bei der Analyse von B-Zell-Populationen dient vor allem die CDR III-Region der rearrangierten $V_H D_H J_H$ -Genverbindungen als klonaler Marker und gibt Hinweise auf evtl. Verwandtschafts-Verhältnisse innerhalb der analysierten B-Zellpopulation.

Die Haupt-B-Zellpopulationen im PB des Menschen sind $CD27^- IgM^+ IgD^+$ naive B-Zellen und $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen. Unter den $CD27^+$ Gedächtnis-B-Zellen befinden sich hauptsächlich Ig-klassen-gewechselte- (IgA^+ , IgG^+ , IgE^+), $IgM^+ IgD^+$ - und $IgM^+ IgD^-$ schwache B-Zellen (Klein et al., 1998). Die terminale Differenzierung der B-Zellen ist im Stadium der Plasmazelle, die hochaffine AK sezerniert, abgeschlossen (Radbruch et al., 2006).

1.1.3 Das BCR-Signal

B-Zellen sind lebenslang von der Expression eines funktionellen, Signal-sendenden BCR abhängig (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997; Monroe, 2006). Die Hauptaufgaben des BCR liegen in der Bindung von Pathogenen und in der Übermittlung eines tonischen Überlebens- sowie eines Aktivierungs-Signals an die B-Zelle. Der BCR besteht aus dem AK und den Signal-sendenden Ig α und Ig β Molekülen. Die zytoplasmatischen Domänen von Ig α und Ig β tragen ITAM (engl. immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) Strukturen. Eine Aktivierung der B-Zelle erfolgt durch die Antigen-Bindung und Kreuzvernetzung der BCR und führt direkt zur Aufhebung der Autoinhibition der Signalkinase SYK sowie zur Aktivierung der SRC-Kinase LYN. LYN und SYK phosphorylieren die ITAMs in Ig α und Ig β (Reth und Brummer, 2004). Die phosphorylierten ITAMs führen zur Signalverstärkung durch eine weitere Rekrutierung und Aktivierung von SYK sowie von BTK (engl. Bruton's tyrosine kinase) (Reth und Brummer, 2004).

Die Signalkaskade führt im weiteren zur Phosphorylierung und Aktivierung der Phospholipase C γ (PLC γ) und der Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K). Diese Enzyme sorgen für die Produktion der zweiten Vermittler (engl. second messenger) und fördern somit die Lokalisation der B-Zell-Signalmoleküle an der Plasmamembran und den Ausschuss von intrazellulären Ca²⁺ (Aman und Ravichandran, 2000). Ca²⁺ und der zweite Vermittler Diacylglycerol führen zur Aktivierung der ERK (engl. extrazellulär signal-regulated kinase), JNK (engl. c-JUN NH₂-terminal kinase) und p38 MAPK (engl. mitogen-activated protein kinase) Enzyme sowie zur Freigabe des Transkriptionsfaktors (TF) NF- κ B (nukleärer Faktor- κ B). Die terminalen Kinasen können ausser NF- κ B verschiedene andere TF aktivieren bzw. inhibieren (Niir und Clark, 2002).

Das BCR-Signal wird zusätzlich über verschiedene Rezeptoren und die damit verbundene Aktivierung von Phosphatasen negativ reguliert. Die Stärke und die Balance der aktivierten Kinasen und Phosphatasen durch positive und negative Rückkopplungsmechanismen sind entscheidend für das Zell-Überleben, die Zell-Proliferation oder den Zelltod (Niir und Clark, 2002).

1.1.4 Die Keimzentrumsreaktion

Die Bildung von Keimzentren (engl. germinal center, GC) geschieht in peripheren lymphoiden Organen. Reife naive B-Zellen durchwandern diese lymphoiden Organe und können dort durch Antigenkontakt mit oder ohne T-Zell-Stimulation aktiviert werden. Durch T-Zellen aktivierte B-Zellen beginnen in primären Follikeln z.B. der Tonsille oder des Lymphknotens zu proliferieren. Primäre Follikel bestehen hauptsächlich aus ruhenden B-

und follikulären dendritischen Zellen (engl. follicular dendritic cells, FDC) (Rajewsky, 1996). T-Zellen verteilen sich zum grössten Teil extra-follikulär in der parakortikalen Region. Die Verdrängung der ruhenden durch die aktivierten, sich teilenden B-Zellen führt zur Bildung eines proliferierenden Follikelkerns und einer ruhenden Mantelzone aus naiven B-Zellen. Die proliferierenden B-Zellen, die Zentroblasten, bilden so ein GC in einem nunmehr sekundären Follikel (MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). Im weiteren Verlauf der GC-Reaktion bildet sich eine helle Zone mit einem Netzwerk aus FDC, T-Helferzellen, Makrophagen und ruhenden B-Zellen und eine dunkle Zone mit den stark proliferierenden Zentroblasten aus (Kroese et al., 1990). In der dunklen Zone des GC findet der Prozess der somatischen Hypermutation (SHM) der Ig-Gene statt und sorgt für die Affinitätsreifung der BCR und somit für eine langlebige, hochaffine Immunantwort auf ein gegebenes Pathogen (Berek et al., 1991; Jacob et al., 1991; Küppers et al., 1993; Liu et al., 1989).

Bei der SHM werden Punktmutationen in die rearrangierten V-Gene der schweren und leichten AK-Ketten eingeführt. In einigen Fällen führt die SHM auch zu Deletionen und Duplikationen in diesen Bereichen (Goossens et al., 1998). Die Mutationsrate liegt bei 10^{-3} - 10^{-4} /bp/Zellteilung (Kocks und Rajewsky, 1989; McKean et al., 1984). Die Proliferation der Zentroblasten wird hin und wieder eingestellt und die B-Zellen konkurrieren mit den veränderten BCR-Affinitäten um die auf den FDC präsentierten Antigene. Positiv-selektionierte B-Zellen differenzieren entweder direkt in Gedächtnis-B-Zellen oder Plasmablasten oder starten eine neue Runde der Proliferation und SHM im GC (Abb. 2) (Arpin et al., 1995; Kocks und Rajewsky, 1989; MacLennan, 1994; Rajewsky, 1996). In vivo Analysen zur GC-Reaktion konnten zeigen, dass GC-B-Zellen sich hauptsächlich entweder innerhalb der hellen oder der dunklen Zone des GC bewegen und auf ihre veränderten BCR-Affinitäten getestet werden (Allen et al., 2007; Hauser et al., 2007a; Schwickert et al., 2007). GC-B-Zellen der dunklen Zone werden wahrscheinlich durch eine Kontaktaufnahme mit randständigen T-Zellen und konventionellen dendritischen Zellen selektiert (Hauser et al., 2007b). Zellen mit gleichbleibender bzw. einer verschlechterten Antigen-Affinität oder BCR-destruktiven Mutationen, wie Stop-Kodons oder Leseraster-verschiebungen, sterben durch Apoptose (Liu et al., 1989). Durch die SHM tragen Mitglieder eines Zellklons die gleiche V-Genumlagerung, unterscheiden sich jedoch im Muster der neu eingeführten Mutationen (Abb. 2). Diese intraklonale Diversität ist ein charakteristisches Merkmal expandierter B-Zellklone in GC (Jacob et al., 1991; Küppers et al., 1993). Der Prozess des Ig-Isotypen-Klassenwechsels (KW) im GC führt bei gleichbleibender Antigen-Affinität zu veränderten Effektorfunktionen der AK.

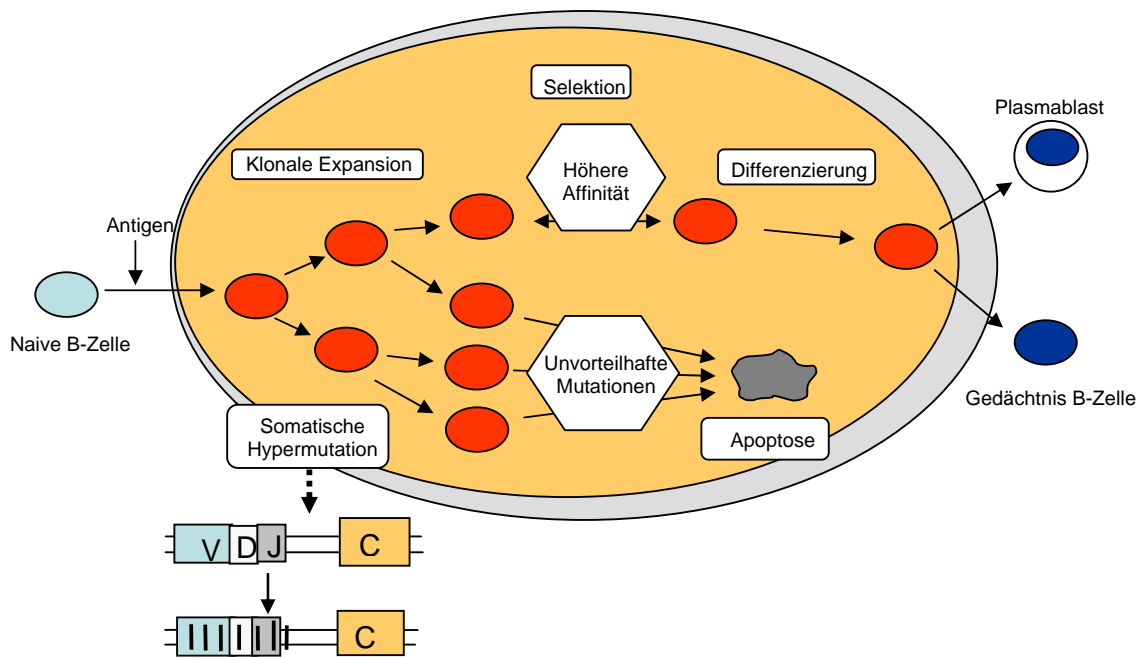


Abb. 2: Schematische Darstellung der Keimzentrsreaktion in einem sekundären Follikel. Die B-Zellen sind als Kreise dargestellt. Die Antigen-aktivierte naive B-Zelle wandert in ein Follikel ein. Dort finden die klonale Expansion, die SHM der V-Genverbindungen, die Selektion und Differenzierung der B-Zellen statt. Zellen mit unvorteilhaften Mutationen sterben durch Apoptose.

T-Zellen sind bei der Ausbildung von GC u.a. durch die Expression des CD40-Liganden (CD40L) CD154 beteiligt. Die CD40-Rezeptor (CD40R)-Aktivierung der B-Zellen durch den CD40L stellt ein positives Überlebenssignal für die Zelle dar und führt zur Aktivierung und Proliferation der B-Zellen (Liu et al., 1989; Mangeney et al., 1991). Die CD40R-Aktivierung induziert zudem den KW und fördert beim Austritt aus dem GC die B-Zelldifferenzierung in Richtung Gedächtnis-B-Zelle (Arpin et al., 1995; Liu und Banchereau, 1997). CD40L- bzw. CD40R-defiziente Mäuse bilden keine GC und es findet weder eine SHM noch ein KW statt (Kawabe et al., 1994; Xu et al., 1994). Das CD40-Signal führt über die Bindung von Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptor (TNFR)-assoziierten Faktoren (TRAF) zur Aktivierung der ERK-, JNK-, p38/MAPK- und NF- κ B-Signalwege. Ein T-Zell- und somit CD40-unabhängiger KW kann jedoch auch durch die Bindung von BAFF und APRIL aktiviert werden (Litinskiy et al., 2002). Die BAFF-bindenden Rezeptoren führen zur Aktivierung von TRAFs und NF- κ B und senden somit u.a. auch Überlebenssignale an die Zelle (Mackay et al., 2003; Schiemann et al., 2001). Desweiteren ist die Expression des B-Zell-Lymphom-Proteins 6 (engl. B cell lymphoma 6, BCL-6) für die GC-Reaktion essentiell (Allman et al., 1996; Dent et al., 1997; Ye et al., 1997). BCL-6 ist ein Transkriptions-Repressor, wird hauptsächlich in GC-B-Zellen exprimiert und inhibiert z.B.

den für die B-Zell-Differenzierung wichtigen TF BLIMP (engl. B lymphocyte-induced maturation protein 1) (Cattoretti et al., 1995; Dhordain et al., 1997; Shaffer et al., 2000) sowie die Expression des pro-apoptotischen Proteins p53 (Phan und Dalla-Favera, 2004). Die Inhibition der p53-Expression erlaubt es den GC-B-Zellen, ein gewisses Maß an DNA-Doppelstrangbrüchen, die im Zuge der SHM bzw. des KW auftreten, zu tolerieren (Papavasiliou und Schatz, 2000; Stavnezer et al., 2008).

Die Differenzierung der B-Zelle zum Zentroblasten geht mit einer massiven Expression der Aktivierungs-induzierten Cytidin Deaminase (engl. activation-induced cytidine deaminase, AID) einher (Muramatsu et al., 1999). AID initiiert den KW und die SHM durch eine DNA-Deaminierung von Cytidin zu Uracil in Ig-Wechsel- bzw. in rearrangierten V-Regionen und ist somit für die GC-Reaktion essentiell (Bransteitter et al., 2003; Chaudhuri et al., 2003; Dickerson et al., 2003; Muramatsu et al., 2000; Muramatsu et al., 1999; Petersen-Mahrt et al., 2002; Revy et al., 2000). Diese Deaminierung führt durch einen Doppelstrangbruch und eine Rekombinations-Reaktion zu einem KW bzw. durch DNA-Reparaturereignisse zu einer Mutation. Es wird angenommen, dass die Deaminierung von ca. 70-250 Cytidins pro DNA-Replikationszyklus bei der SHM zielgerichtet an vornehmlich WRC-Motifen (W = A oder T, R = A oder G, C = C) verläuft (de Yebenes und Ramiro, 2006). Die SHM und der KW sind von der Transkription abhängig (Chaudhuri et al., 2003; Fukita et al., 1998; Peters und Storb, 1996). Mutationen werden in funktionelle sowie in nicht-funktionelle V-Genomordnungen eingeführt (Roes et al., 1989).

AID wird hauptsächlich in GC-B-Zellen sowie in einigen extrafollikulär-aktivierten B-Zellen ausgeprägt (Greiner et al., 2005; Muramatsu et al., 1999). Eine einfache Replikation über ein deaminiertes Cytidin führt z.B. zu einer C-T bzw. zu einer G-A Transitions-Mutation. Ein Uracil innerhalb der DNA kann zur Aktivierung von verschiedenen DNA-Reparatur-Prozessen führen. Diese Reparatur-Prozesse, die normalerweise für genomische Stabilität sorgen, sind in GC-B-Zellen vor allem durch das Involvieren von Fehler-behafteten DNA-Polymerasen für eine grosse Vielfalt an Mutationsereignissen und für eine effiziente Affinitätsreifung verantwortlich.

Die SHM und der KW führen zu einer nicht unerheblichen DNA-Destabilisierung. Aus diesem Grund ist eine strenge Kontrolle der AID-Ausprägung und -Aktivität, der Aktivität der AID-Kofaktoren sowie eine Kontrolle der AID-Zielstrukturen für die Zelle unerlässlich und findet vermutlich auf mehreren Ebenen statt. Das effektive Zusammenspiel dieser Kontrollmechanismen während der GC-Reaktion kontrolliert somit einerseits eine zielgerichtete Affinitätsreifung sowie einen adäquaten KW und andererseits eine genomische Stabilität der nicht-Ig-Loci. Missglückt diese vielschichtige Kontrolle, so kann

es zu einer weitläufigen genomischen Instabilität kommen. Fehlgerichtete Mutationen wurden in normalen GC-B-Zellen in z.B. CD79a und -b, Bcl-6 und CD95 gefunden (Gordon et al., 2003; Müschen et al., 2000b; Shen et al., 1998). Aberrante somatische Hypermuation (ASH) ist eine fehlgerichtete Hypermuation, die in malignen jedoch nicht in normalen B-Zellen vorkommt. Sie wurde zuerst in den Genen für Pim1, Myc, Rho H und Pax 5 von diffus-grosszelligen Lymphomen nachgewiesen (Pasqualucci et al., 2001).

1.2 Das Epstein-Barr Virus

Das Epstein-Barr virus (EBV) gehört zur Familie der γ -Herpesviren und ist auch bekannt unter dem Namen „humanes Herpesvirus 4“. Wie alle Herpesviren besitzt EBV einen latenten und einen lytischen Zyklus (Rickinson und Kieff, 2001). Über 90% der Menschen weltweit sind latent mit EBV infiziert (Küppers, 2003). EBV infiziert bevorzugt B-Zellen und verbleibt in diesen als vorwiegend harmloses Virus. Die Entdeckung von EBV 1964 beruht auf der elektronen-mikroskopischen Suche von Epstein, Achong und Barr nach einem Virus im zentralafrikanischen Burkitt Lymphom (BL). EBV ist damit als erstes menschliches Tumovirus identifiziert worden (Epstein et al., 1965). Die tumorigenen Eigenschaften des Virus zeigen sich vor allem darin, dass EBV normale B-Zellen in vitro zu unsterblichen Zelllinien transformieren kann (Henle et al., 1967). Diese lymphoblastoiden Zelllinien (engl. lymphoblastoid cell lines, LCLs) sind durch EBV aktiviert und verändern ihre Zellmorphologie. Nach einer Wachstumskrise wird in den LCLs die zelluläre Telomerase reaktiviert und die Zellen dadurch immortalisiert (Bornkamm und Hammerschmidt, 2001). LCLs sind z.B. zur Analyse der tumorigenen Eigenschaften und Regulationsmechanismen verschiedener latenter EBV-Proteine ein wichtiger Bestandteil der EBV-Forschung (Rickinson und Kieff, 2001).

1.2.1 Infektion und Persistenz

Die Ansteckung mit EBV verläuft gewöhnlich über den Speichel zwischen zwei Individuen und führt im Kindesalter zu einer asymptomatischen Infektion und zur lebenslangen Persistenz des Virus in den B-Zellen (Fleisher et al., 1979; Golden et al., 1973). Eine verzögerte Infektion in der Pubertät oder im jungen Erwachsenenalter kann jedoch zu der Erkrankung „infektiöse Mononukleose (IM)“ führen (Henle et al., 1968; Sawyer et al., 1971). Bei dieser selbst-limitierenden Erkrankung findet eine starke Zellteilung EBV-infizierter B-Zellen statt, so dass bis zu 1% der peripheren Blut (PB) B-Zellen mit dem Virus infiziert sein können. Der sich ausbreitende Virus wird durch eine massive NK- (engl. natural killer) und T-Zell-Immunantwort kontrolliert und nach wenigen Wochen sind fast

alle EBV-infizierten B-Zellen verschwunden (Callan et al., 1998). Die seltenen, übrig gebliebenen EBV⁺ B-Zellen sind in die virale Persistenz übergegangen und können von NK- und T-Zellen nicht mehr erkannt werden (Küppers, 2003; Vetsika und Callan, 2004). Die Frequenz EBV⁺ B-Zellen variiert zwischen Individuen von 1-10 in 10⁶, bleibt innerhalb eines Virus-Trägers jedoch über viele Jahre stabil (Khan et al., 1996). EBV kann prinzipiell auch Epithelzellen infizieren (Pegtell et al., 2004; Tugizov et al., 2003). Eine Infektion von Epithelzellen ist vermutlich wichtig für die Virusvermehrung und -freisetzung in den Speichel (Thorley-Lawson, 2005; Tugizov et al., 2003). Eine Rolle bei der Etablierung der EBV-Persistenz ist hingegen eher unwahrscheinlich (Niedobitek et al., 2000).

Die Infektion der B-Zellen verläuft über die Anheftung des viralen Membranglykoproteins p350/220 an den B-Zell-Komplementrezeptor CD21 (Nemerow et al., 1985; Tanner et al., 1987). Nach der Anheftung wird die folgende Endozytose vom MHC II Komplex auf der B-Zelle unterstützt (Haan et al., 2000; Haan und Longnecker, 2000). Anschließend zirkularisiert das vorerst lineare, 172 kbp lange, doppelsträngige DNA-Molekül des Virus im Kern der B-Zelle zu einem Episom. Wenige Tage nach der Zell-Infektion wird das Virus-Genom amplifiziert, so dass pro Zelle zwischen 10-100 EBV-Episome vorhanden sind (Hurley und Thorley-Lawson, 1988; Kintner und Sugden, 1979). Teilt sich die EBV-infizierte B-Zelle, so werden die Episome gleichmässig auf die Tochterzellen verteilt. Die Differenzierung der EBV-infizierten B-Zelle zur Plasmazelle führt zur Aktivierung des EBV lytischen Zyklus (Laichalk und Thorley-Lawson, 2005; Sun und Thorley-Lawson, 2007). Im lytischen Zyklus entstehen neue Viruspartikel, die infizierte B-Zelle stirbt und es kann im Mundrachenraum über den Speichel zur Infektion neuer Individuen bzw. zur Infektion neuer B-Zellen im gleichen Virus-Träger kommen (Golden et al., 1973). EBV kann sich somit latent wie auch durch den lytischen Zyklus verbreiten.

EBV kann in den B-Zellen verschiedene Latenzzustände annehmen und beweist damit eine enorme Anpassung an die B-Zellphysiologie. Die B-Zell-Spezifität von EBV wird durch die Abhängigkeit des Latenz III-Promotors von dem B-Zell-spezifischen TF PAX5 erreicht (Tierney et al., 2007). Die Infektion der B-Zelle führt zunächst zur Latenz III (Alfieri et al., 1991). In diesem Latenz-Stadium werden 12 latente Gene des EBV ausgeprägt. Zu diesen gehören die latenten Membranproteine LMP1, -2A und -2B sowie die nukleären Proteine (engl. EBV nuclear antigens, EBNA) EBNA1, -2, -3A, -3B, -3C und EBNA-LP, zwei nicht-polyadenylierte RNAs, EBER1 und EBER2 (engl. EBV-encoded RNA) sowie die BARTs (engl. BamHI A fragment rightward transcripts), eine Familie von RNA-Molekülen, die durch alternatives Spleissen eines Transkriptes entstehen. Die Latenz III wird auch in LCLs ausgeprägt. Das Latenzstadium II zeichnet sich durch die Expression

von EBNA1, LMP1, LMP2A und -2B sowie die Expression der EBER- und BART-Transkripte aus (Küppers, 2003). In der Latenz 0 hingegen werden nur noch die EBER- und BART-Transkripte und evtl. noch LMP2A exprimiert (Chen et al., 1995; Hochberg et al., 2004a; Küppers, 2003; Miyashita et al., 1997; Tierney et al., 1994). Es wird vermutet, dass EBV bevorzugt naive B-Zellen infiziert, diese aktiviert und dann im Zuge einer GC-Reaktion eine lebenslange Persistenz in Gedächtnis-B-Zellen ausbildet (Thorley-Lawson, 2001). Unterstützt wird diese Vermutung durch den Befund, dass EBV in tonsillären naiven B-Zellen eine Latenz III, in GC-B-Zellen eine Latenz II und in peripheren Gedächtnis-B-Zellen eine Latenz 0 ausprägt (Babcock et al., 2000; Joseph et al., 2000). Dieses Szenario beschreibt eine weitestgehende Anpassung des Virus an die verschiedenen B-Zell-Differenzierungsstadien und impliziert die Notwendigkeit einer GC-Reaktion zur Persistenz-Entwicklung von EBV (Thorley-Lawson, 2001). Durch die Ausprägung der Latenz 0 und der damit verbundenen Reduktion immunogener EBV-Proteine bleibt das Virus in der Persistenz von zytotoxischen T-Zellen weitestgehend unentdeckt (Miyashita et al., 1997). Die Latenz 0, in seltenen, sichteilenden Zellen begleitet von einer EBNA1-Expression, konnte im PB von gesunden Individuen wie auch in IM-Patienten nachgewiesen werden (Hochberg et al., 2004a; Hochberg et al., 2004b). Eine Latenz I mit der Expression von EBNA1 und den EBER- sowie BART-Transkripten findet sich hauptsächlich im BL (Küppers, 2003).

Die Ausnutzung der B-Zell-Differenzierungsstadien durch EBV zur Entwicklung einer lebenslangen Persistenz wird kontrovers diskutiert. Histologische Untersuchungen von GC in der EBV-Persistenz zeigten nur selten EBV-positive B-Zellen innerhalb der GC (Araujo et al., 1999; Kobayashi et al., 1998). Das LMP1 Protein blockiert zudem die Ausprägung des für die GC-Reaktion essentiellen Bcl-6 Proteins (Cattoretti et al., 1997; Dent et al., 1997; Ye et al., 1997) und es wurde beschrieben, dass in LMP1-transgenen Mäusen die Ausbildung von GC blockiert ist (Uchida et al., 1999). Auch während der IM scheinen EBV⁺ B-Zellen nicht an dem Differenzierungsstadium der GC-Reaktion teilzunehmen. EBV befindet sich zwar in B-Zellen mit mutierten V-Genomordnungen, jedoch tragen die expandierten EBV-Klone keine intraklonalen Mutationen und haben somit die SHM deaktiviert (Kurth et al., 2000). In IM-Tonsillen können die EBV⁺ B-Zellen unterschiedliche Latenzformen annehmen. Hierzu gehört z.B. auch eine eher ungewöhnliche Latenz IV mit der Expression von EBNA2, den EBER-Transkripten, aber ohne die gleichzeitige Expression von LMP1 (Kurth et al., 2003; Niedobitek et al., 1997a).

1.2.2 Latente Genprodukte

Das EBV-Genom kodiert u.a. für neun verschiedene latente Proteine, zwei nicht-polyadenylierte RNAs und die BART-Transkripte (s.o.). Es sind vor allem die latenten Proteine, die für die vielfältigen Interaktionen des Virus mit den zellulären Regulationsmechanismen verantwortlich sind und auf diesem Weg zur Ausbreitung des Virus und zur Etablierung der viralen Persistenz beitragen. Molekulares Mimikry erlaubt es einigen latenten EBV-Proteinen zudem zelluläre Proteine in ihrer Wirkungsweise nachzuahmen und gleichzeitig deren Regulationsmechanismen zu umgehen.

EBNA1 ist ein Sequenz-abhängiges DNA-bindendes Protein, das durch die Bindung an den Replikations-Ursprung (oriP) für die Replikation des viralen Genoms verantwortlich ist (Summers et al., 1996; Wysokenski und Yates, 1989; Yates et al., 2000; Yates et al., 1985). Zusätzlich sorgt EBNA1 auch während der Mitose für die korrekte Verteilung der Episome auf die Tochterzellen. EBNA1 ist somit zur Erhaltung des viralen Genoms in sich teilenden EBV⁺ B-Zellen der verschiedenen Latenzstadien unerlässlich (Aiyar et al., 1998). Es ist zudem beschrieben, dass EBNA1 auch für die Transkription des viralen Cp Promotors und somit für die Expression der anderen transformierenden Proteine nach der Infektion von B-Zellen erforderlich ist (Altmann et al., 2006). Eine Glycin-Alanin Wiederholung in der EBNA1-Peptidsequenz verhindert die effektive proteolytische Spaltung des Proteins. EBNA1 ist daher nur sehr wenig immunogen (Levitskaya et al., 1995).

EBNA2 ist der Hauptaktivator viraler und zellulärer Gene und für die Wachstums-Transformation von B-Zellen essentiell (Bornkamm et al., 1982; Miller et al., 1974). Die Aktivität von EBNA2 ist zum Teil von der Bindung an den zellulären Transkriptions-Repressor CBF1 abhängig und es wurde gezeigt, dass die CBF1/EBNA2-Bindung für die Transformation von B-Zellen verantwortlich ist (Hsieh und Hayward, 1995; Ling et al., 1993; Yalamanchili et al., 1994; Zimmer-Strobl et al., 1994). CBF1 wird normalerweise von Notch-1 reguliert. EBNA2 ahmt in seiner Wirkungsweise somit einen aktivierten Notch-1-Rezeptor nach (Hjalgrim et al., 2003; Strobl et al., 1997). Tatsächlich kann Notch-1 die Funktion von EBNA2 in immortalisierten B-Zellen teilweise ersetzen (Gordadze et al., 2001; Höfelmayr et al., 2001). EBNA2 ist u.a. für die Aktivität der EBV Cp-, LMP1- und LMP2-Promotoren sowie z.B. auch für die Ausprägung der zellulären Proteine CD21, CD23, CCR7, AML-2, FcRH5, HES-1, c-Myc, des AP-1-Inhibitors BATF und IRTA2 verantwortlich (Burgstahler et al., 1995; Cordier et al., 1990; Johansen et al., 2003; Kaiser et al., 1999; Mohan et al., 2006; Spender et al., 2002; Wang et al., 1987; Wang et al., 1990). Gen-reprimierende Eigenschaften von EBNA2 wurden z.B. für den Schwerketten-Lokus

beschrieben (Jochner et al., 1996), so dass LCLs in der Latenz III nur eine geringe BCR-Ausprägung aufweisen.

Die EBNA3-Proteine sind an der Transkriptions-Regulation und Proliferation der latent EBV-infizierten B-Zellen beteiligt. Für die Immortalisierung von B-Zellen sind die EBNA3A- und EBNA3C-Proteine unerlässlich (Tomkinson et al., 1993). Eine der Aufgaben der EBNA3-Proteine ist vermutlich die post-translationale EBNA2-Regulation, da sie wie EBNA2 an CBF1 binden und die EBNA2-Bindung an CBF1 dadurch inhibieren können (Dalbès-Tran et al., 2001; Johannsen et al., 1996; Robertson et al., 1995; Waltzer et al., 1996). Zudem inhibieren alle EBNA3-Proteine den Zellzyklus-Arrest am G2/M Übergang (Krauer et al., 2004). EBNA-LP gehört zusammen mit EBNA2 zu den ersten zwei Proteinen, die nach der Infektion von B-Zellen gebildet werden, und ist für den Prozess der B-Zell-Transformation als EBNA2-Coaktivator essentiell (Harada und Kieff, 1997; Mannick et al., 1991; Nitsche et al., 1997; Peng et al., 2004a; Peng et al., 2004b; Peng et al., 2000).

Das LMP1 Protein ist ein integrales Membranprotein und ahmt durch die CTAR (C-terminalen aktivierenden Regionen)-1 und -2 in seiner Wirkungsweise einen aktivierten CD40R nach (Gires et al., 1997; Kilger et al., 1998) (Abb. 3). Die LMP1 CTAR-1 Domäne kann dabei von den TRAF-1, -2, -3 und -5 gebunden werden. Die CTAR-2 hingegen bindet TRADD (TNF-receptor associated death domain protein) und RIP (TNF α related receptor interacting protein) und rekrutiert TRAF-2 und über weitere Proteine TRAF6 (Devergne et al., 1996; Izumi et al., 1999; Luftig et al., 2003; Mosialos et al., 1995; Wu et al., 2006). Die Aktivierung von TRAF-3 über die CTAR-1 ist für die Aktivierung von NIK (engl. NF- κ B-inducing kinase), IKK- α (engl. inhibitor of κ B kinase) und die damit verbundene NF- κ B-Freisetzung über den nicht-kanonischen NF- κ B-Signalweg in den Zellkern verantwortlich (Luftig et al., 2004). Die CTAR-2-Bindung an TRADD verdeckt die pro-apoptotische Funktionsdomäne von TRADD und aktiviert über TRAF-6 und TAK1 den kanonischen NF- κ B-Signalweg (Schneider et al., 2008; Wu et al., 2006).

Die meisten regulatorischen Funktionen von LMP1 gehen auf die Aktivierung von NF- κ B zurück (Cahir-McFarland et al., 2000). LMP1 aktiviert zudem die JAK-STAT, die PI3K- und JNK-Signalwege (Dawson et al., 2003; Gires et al., 1999; Kieser et al., 1997; Zhang et al., 2004). Die wichtigsten Unterschiede von LMP1 zu einem aktivierten CD40R liegen darin, dass LMP1 TRADD binden kann und durch die Ligand-unabhängige Bildung von LMP1-Aggregaten im Gegensatz zum CD40R ein konstitutives Signal sendet (Gires et al., 1997; Kieser et al., 1999).

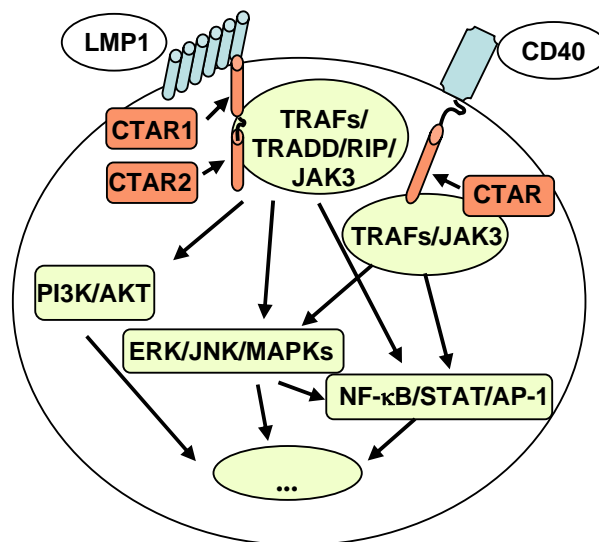


Abb. 3: Schematische Darstellung des molekularen Mimikry der CD40-Signalkaskade durch LMP1 in einer B-Zelle. Zu sehen sind die Membran-ständigen LMP1- und CD40-Moleküle mit den cytoplasmatischen CTAR-Domänen. CTAR-assoziierte Faktoren führen zur Aktivierung der angezeigten Signalkaskaden.

Transformierende Eigenschaften von LMP1 zeigen sich vor allem darin, dass LMP1 für die Proliferation EBV-immortalisierter B-Zellen unerlässlich ist (Kaye et al., 1993; Kilger et al., 1998) und in transgenen Mäusen B-Zell-Lymphome induziert (Kulwichit et al., 1998). LMP1 kann zudem die Induktion der anti-apoptotisch-wirkenden Proteine BCL-2, A20 und Mcl-1 induzieren und auf diesem Weg die B-Zelle vor der Apoptose schützen (Henderson et al., 1991; Laherty et al., 1992; Wang et al., 1996). Das LMP1-Signal inhibiert die Expression von BCL-6 (Cattoretti et al., 1997), so dass in LMP1-transgenen Mäusen zwar ein B-Zell-KW stattfinden konnte, jedoch keine SHM und keine GC gefunden werden konnten (Uchida et al., 1999). Eine Fusion der zytoplasmatischen Domäne von LMP1 und der Transmembran-Domäne des CD40R zeigte, dass ein Ligand-abhängiges LMP1-Signal das CD40-Signal vollständig ersetzen kann ohne B-Zellen zu hyperaktivieren oder auffällig in die Proliferation zu treiben (Rastelli et al., 2008). Über die NF-κB-abhängige Aktivierung von BAFF und APRIL, zwei wichtigen Überlebenssignalen von B-Zellen (s. 1.1.4), kann LMP1 einen T-Zell-unabhängigen KW induzieren (He et al., 2003).

LMP2A und LMP2B sind verwandte Proteine und unterscheiden sich nur in der hydrophilen N-terminalen Domäne von LMP2A. Die N-terminale hydrophile Domäne von LMP2A beinhaltet wie Igα und Igβ des BCR ITAM-Motive (engl. immunoreceptor tyrosine activation motive) (Beaufils et al., 1993), die nach Phosphorylierung die Tyrosinkinasen LYN und SYK aktivieren können. LMP2A ahmt somit ein BCR-Signal nach (Abb. 4). Im Gegensatz zum BCR sendet LMP2A jedoch ein konstitutives Signal (Longnecker, 2000).

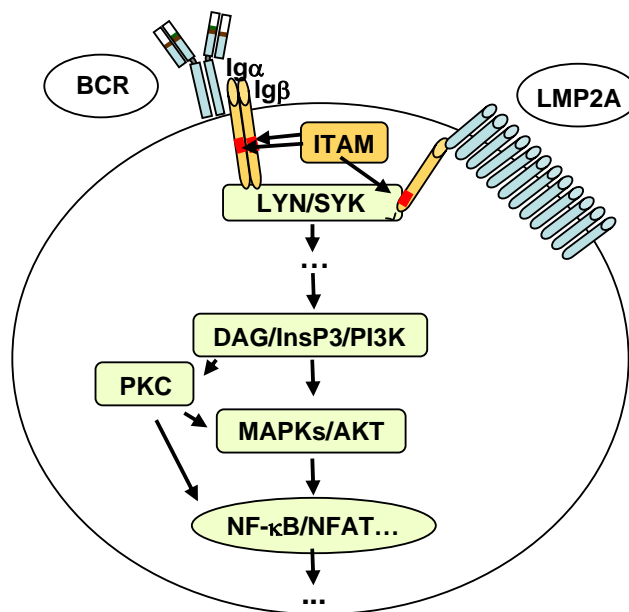


Abb. 4: Schematische Darstellung des molekularen Mimikry der BCR-Signalkaskade durch LMP2A in einer B-Zelle. Zu sehen sind die Membran-ständigen LMP2A- und BCR-Moleküle mit den cytoplasmatischen ITAM-Motiven. Die ITAM-assoziierten Kinasen LYN und SYK aktivieren die angezeigten Signalkaskaden.

In transgenen Mäusen konnte gezeigt werden, dass LMP2A das BCR-Signal potentiell ersetzen kann. So erlaubt LMP2A z.B. BCR-losen B-Zellen der Maus das Überleben in der Peripherie (Caldwell et al., 1998; Casola et al., 2004). Durch die Rekrutierung von LYN und SYK sowie durch den Ausschluss des BCR aus dem B-Zell-Signalosom durch LMP2A-Aggregatbildung reduziert LMP2A die Bindung dieser Tyrosinkinasen an den BCR und vermindert auf diese Weise die Aktivierung des BCR nach Antigenbindung bzw. inhibiert die BCR-induzierte Apoptose (Dykstra et al., 2001; Fukuda und Longnecker, 2005; Miller et al., 1995; Miller et al., 1994). Ferner bindet LMP2A E3-Protein-Ubiquitin-Ligasen, die sowohl SYK und LYN als auch LMP2A ubiquitinieren und damit destabilisieren können (Ikeda et al., 2003; Winberg et al., 2000). LMP2A kann demnach das Überlebenssignal des BCR ersetzen und gleichzeitig die Schwelle der Antigen-Aktivierung und -Prozessierung der B-Zellen sowie der damit verbundenen Reaktivierung des EBV-lytischen Zyklus heraufsetzen (Miller et al., 1995). Es konnte gezeigt werden, dass die ITAM-Motive für diese Funktionen von LMP2A essentiell sind (Fruehling und Longnecker, 1997; Merchant et al., 2000).

Die nicht-polyadenylierten EBER-Transkripte, EBER1 und EBER2, werden durch die RNA-Polymerase III generiert und nicht translatiert (Arrand und Rymo, 1982; Lerner et al., 1981; Rosa et al., 1981). Sie sind mit bis zu 10^7 RNA-Molekülen pro Zelle die am stärksten ausgeprägten Transkripte in allen Latenzstadien (Arrand und Rymo, 1982;

Delecluse et al., 2007; Gilligan et al., 1990; Howe und Steitz, 1986). Durch die starke Ausprägung der EBER kann die Detektion von EBV⁺ B-Zellen am verlässlichsten und sensitivsten durch eine EBER-In-Situ-Hybridisierung (EBER-ISH) durchgeführt werden (Khan et al., 1992). Die Funktion der EBV-BART-Transkripte war lange unbekannt. Erst kürzlich wurde gezeigt, dass sie für Mikro-RNAs (miRs) kodieren (Pfeffer et al., 2004). Die latenten Genprodukte von EBV beeinflussen die zellulären Regulationsmechanismen der Transkription, Proliferation und des Zell-Überlebens eindringlich und können auf diesem Weg potentiell eine maligne B-Zell-Transformation fördern.

1.3 EBV-assoziierte GC-B-Zell-Lymphome

Lymphome sind die fünft-häufigsten Krebserkrankungen der westlichen Welt. In 95% der Lymphome stammen die Krebszellen von B-Zellen ab und in den meisten Fällen hat die maligne Transformation im GC stattgefunden (Küppers, 2005). Die WHO (engl. world health organization) für Lymphome unterscheidet zwischen 15 verschiedenen B-Zell-Lymphomen (Jaffe E. S., 2001). Sie unterscheiden sich in ihrer Häufigkeit, in ihrem klinischen Verhalten und vor allem in der Art der genetischen Aberrationen, die zur malignen Transformation der Zelle geführt haben.

Prinzipiell gibt es drei Stadien in der B-Zellentwicklung und -differenzierung, in denen die Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der genomischen Stabilität bewusst umgangen werden. Das erste Stadium bildet hierbei die V_HD_HJ_H- bzw. V_LJ_L-Rekombination im Knochenmark, wo RAG-generierte DNA-Doppelstrangbrüche normalerweise zu einer V_HD_HJ_H- bzw. V_LJ_L-Genumlagerung prozessiert werden (s. 1.1.2). Eine fehlgerichtete Reparatur der DNA-Doppelstrangbrüche kann jedoch zu Chromosomen-Translokationen führen. Bei Translokations-Ereignissen in B-Zell-Lymphomen wird üblicherweise ein Proto-Onkogen, wie BCL-1 im Mantelzell-Lymphom oder BCL-2 im follikulären Lymphom, in die Nähe der regulatorischen Elemente der Ig-Loci transloziert. Dadurch kommt es zu einer fehlgesteuerten Onkogen-Aktivierung und somit zur Transformation der Zelle (Küppers, 2005; Shaffer et al., 2002). Chromosomen-Translokationen innerhalb der Ig-Genumlagerungen finden hauptsächlich auf den nicht-produktiven Allelen statt, so dass die Expression eines funktionellen BCR stets gegeben ist (Vaandrager et al., 1998). Das zweite und dritte Stadium, in denen die genomische Integrität bewusst verletzt wird, bilden die SHM und der KW während der GC-Reaktion. Hier kann es durch eine Imbalance der jeweiligen Kontrollmechanismen ebenfalls zu Chromosomen-Translokationen bzw. zu Punktmutationen kommen, die zur Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen bzw. zur Aktivierung von Onkogenen führen können. Beispiele für SHM-

und KW-assoziierte Translokationen sind das endemische bzw. das sporadische Burkitt Lymphom (BL) (Goossens et al., 1998; Küppers und Dalla-Favera, 2001; Neri et al., 1988; Pelicci et al., 1986; Rabbitts et al., 1983). Neben der Aktivierung von Onkogenen bzw. der Inaktivierung von Tumor-Suppressorgenen können auch virale Onkogene, z.B. in EBV-infizierten B-Zellen, eine entscheidende Rolle bei der Transformation der Zelle spielen.

EBV-assoziierte B-Zell-Lymphome stammen alle von GC-B-Zellen ab (Abb. 5). Zu diesen GC-B-Zell-Lymphomen gehören ca. 95% der endemischen BL, ca. 40% der klassischen HL und in immungeschwächten Patienten die PTLD-Subtypen des polymorphen PTLD und immunoblastischen diffus-grosszelligen B-Zell-Lymphoms (DLBCL) (Brady et al., 2007; Bräuninger et al., 2006; Capello et al., 2003; Carbone und Gloghini, 2005). Die EBV-Infektion scheint in diesen Lymphomen ein frühes und wichtiges transformierendes Ereignis für die Zelle zu sein, da klonale EBV-Genome in jeder Zelle des jeweiligen Tumorklons zu finden sind. Die Seltenheit, mit der EBV in anderen B-Zell-Lymphomen bzw. in normalen PB-B-Zellen vorhanden ist, unterstützt die Annahme, dass EBV eine tragende Rolle in der Pathogenese der o.g. Tumore spielt. Die EBV-positiven GC-B-Zell-Lymphome werden im Weiteren vorgestellt.

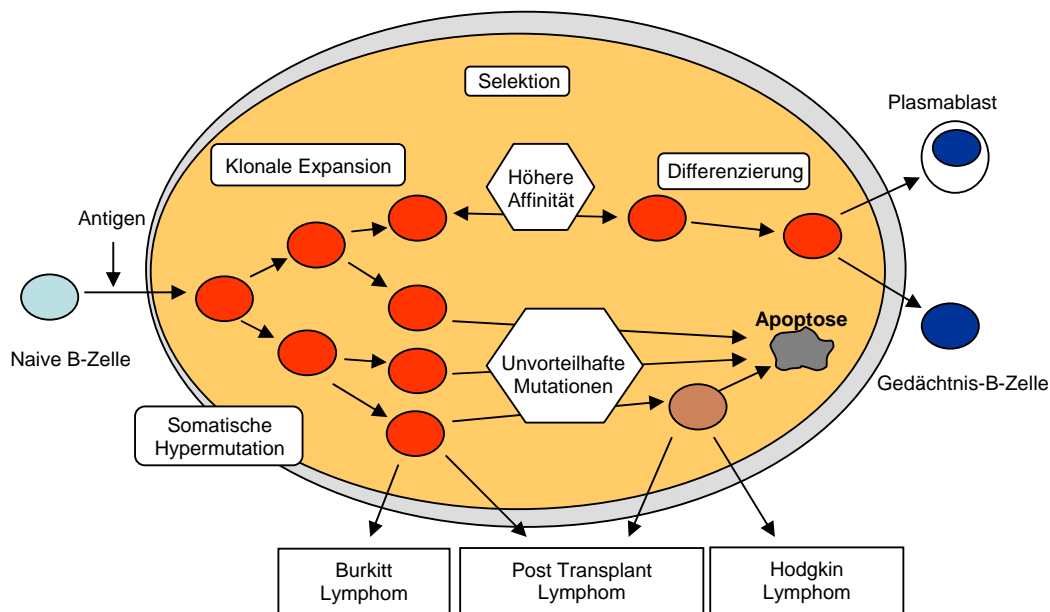


Abb. 5: Schematische Darstellung des vermuteten Ursprungs der GC-B-Zell-assoziierten Lymphome im GC eines sekundären Follikels. Die B-Zellen sind wie in Abb. 3 als Kreise dargestellt. Die putativen Vorläuferzellen des BL, PTLD und HL entstehen aus GC-B-Zellen mit funktionellen (BL und PTLD) und nicht-funktionellen (HL und PTLD) BCR.

1.3.1 Das Burkitt Lymphom

Das BL gehört zu den aggressiven B-Zell-Lymphomen. Es werden die drei Formen des sporadischen, des endemischen und des HIV-assoziierten BL unterschieden. Das sporadische BL macht ca. 1-2% der B-Zell-Lymphome in der westlichen Welt aus und ist nur selten EBV-positiv. Humanes-Immundefizienz-Virus (HIV)-assoziierte BL-Fälle sind zu ca. 30% EBV-positiv. Das endemische BL ist die häufigste Tumorerkrankung in Äquator-nahen Gegenden von Afrika, in denen ebenfalls die Malaria endemisch auftritt. Die endemischen BL-Fälle sind nahezu alle EBV-positiv (Brady et al., 2007). Das gemeinsame, BL-kennzeichnende Transformations-Ereignis ist die c-Myc-Translokation an entweder den IgH Locus, t (8;14) in ca. 80% der BL-Fälle oder an die IgL Loci t (2;8) bzw. t (8;22) in den übrigen 20% der BL-Fälle (Brady et al., 2007).

C-Myc aktiviert Zelltyp-spezifisch die Proliferation, Differenzierung oder Apoptose und wird normalerweise durch die RAS/MAPK/AKT-Signalwege streng kontrolliert (Sears et al., 1999). Durch die Translokation wird c-Myc konstitutiv und ausschliesslich von dem translozierten Allel exprimiert (ar-Rushdi et al., 1983). Eine c-Myc-Überexpression führt normalerweise zur Aktivierung von p53 und damit zur Apoptose der Zelle (Cherney et al., 1997). Im BL wird dieser Regulations-Mechanismus in ungefähr 1/3 der Fälle durch inaktivierende p53 Mutationen aufgehoben (Farrell et al., 1991; Gaidano et al., 1991). Das BL ist ein typisches GC-B-Zell-Lymphom. Es werden GC-spezifische Proteine wie CD77, CD10, HGAL und BCL-6 ausgeprägt und die Tumorzellen zeigen V-Gen-Mutationen mit teilweise intraklonalen Unterschieden (Chapman et al., 1995a; Chapman et al., 1996).

EBV befindet sich in den meisten BL-Fällen in der vom Qp-Promotor-induzierten Latenz I. Seltene BL-Fälle weichen von der Latenz I ab und zeigen z.B. eine Latenz vom Wp-Promotor mit der Ausprägung von EBNA1, EBNA3A-C und EBNA-LP, jedoch ohne EBNA2 bzw. eine Latenz mit EBNA2, aber ohne LMP1 (Kelly et al., 2002; Kelly et al., 2006; Kelly et al., 2005). Einige Fälle sind zudem LMP2A-positiv (Bell et al., 2006; Tao et al., 1998). Es wird vermutet, dass die Ausprägung einer eingeschränkten Anzahl latenter Genprodukte in den meisten BL-Fällen bzw. die Ausprägung unterschiedlicher Latenzen in einigen BL-Fällen für den anti-apoptotischen Effekt des Virus bei der jeweiligen BL-Entstehung wichtig ist (Brady et al., 2007; Kelly et al., 2006).

1.3.2 Das Hodgkin Lymphom

Das HL ist eines der häufigsten Lymphome der westlichen Welt und kann in die Subtypen des klassischen und des Lymphozyten-prädominanten (LP)-HL unterteilt werden. Zum klassischen HL gehören die Zell-gemischten (engl. mixed cellularity, MC), die nodular-

sklerotischen, die Lymphozyten-reichen und die Lymphozyten-armen Fälle (Bräuninger et al., 2006). Ein wichtiges Charakteristikum des HL ist die Seltenheit der Hodgkin und Reed/Sternberg (HRS)-Tumorzellen im klassischen sowie der lymphozytischen und histiozytischen (L&H)-Tumorzellen im LP-HL in der Tumormasse von ca. 1%. Die übrigen Zellen im Tumor bestehen hauptsächlich aus gesunden, infiltrierenden T-Lymphozyten, Histiozyten, Eosinophilen, Granulozyten und Plasmazellen (Küppers, 2002).

Der Ursprung des klassischen und LP-HL von GC-B-Zellen konnte durch Mikrodisektion einzelner HRS- und L&H-Zellen aus Tumorgewebe und Analyse der rearrangierten V-Gene aufgeklärt werden (Bräuninger et al., 1997; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997). In einigen seltenen Fällen können HRS-Zellen auch von T-Zellen abstammen (Müschel et al., 2000a). Die meisten Fälle (ca. 98%) des klassischen und LP-HL zeigen jeweils klonale und somatisch mutierte V-Genomordnungen. Im Gegensatz zum klassischen HL gibt es im LP-HL eine intraklonale Diversität in den V-Genomordnungen des Tumorklons, die auf die Herkunft der Tumor-Vorläuferzelle von GC-B-Zellen schließen lässt (Bräuninger et al., 1997; Küppers et al., 1994; Marafioti et al., 1997). Die Herkunft des klassischen HL von prä-apoptotischen GC-B-Zellen wird durch das Auffinden von BCR-destruktiven Mutationen in ursprünglich funktionellen V-Genomordnungen der HRS-Zellen in ca. 25% der HL-Fälle indiziert (Kanzler et al., 1996; Küppers und Rajewsky, 1998). Normalerweise leiten B-Zellen, die während der Affinitätsreifung durch SHM im GC BCR-destruktive oder Affinitäts-mindernde Mutationen erfahren haben, und dadurch nicht positiv selektioniert werden, die Apoptose ein (s. 1.1.4) (Liu et al., 1989; Rajewsky, 1996). HRS-Zellen mit BCR-destruktiven Mutationen stammen somit vermutlich von prä-apoptotischen GC-B-Zellen ab, die aufgrund von Transformations-Ereignissen der Apoptose entkommen sind (Abb.5). Es wird vermutet, dass auch die übrigen HL-Fälle evtl. durch nachteilige, Affinitäts-mindernde Mutationen von prä-apoptotischen GC-B-Zellen abstammen (Kanzler et al., 1996; Küppers und Rajewsky, 1998).

Chromosomen-Translokationen spielen in der Pathogenese von B-Zell-Lymphomen eine wichtige Rolle (s. 1.1.5). In einigen seltenen HL-Fällen aus Kombinations-Lymphomen konnten IgH/BCL-1- bzw. IgH/BCL-2-Translokationen gefunden werden (Schmitz et al., 2005; Tinguely et al., 2003). Eine für das HL typische Chromosomen-Translokation wie z.B. die c-Myc Translokation im BL (s. 1.1.5) ist bisher jedoch nicht gefunden worden. Charakteristisch für das klassische HL sind hingegen die nahezu vollständig fehlende B-Zell-Signatur der HRS-Zellen und ein konstitutiv-aktives NF- κ B-Signal (Bargou et al., 1997; Jundt et al., 2002b; Re et al., 2001; Schwering et al., 2003; Torlakovic et al., 2001). Anstelle der fehlenden B-Zell-spezifischen Kinasen und TF findet man im HL eine noch

weitestgehend ungeklärte aberrante Ausprägung von multiplen Signalkaskaden ursprünglich anderer Zelltypen, die durch die Aktivierung anti-apoptotischer und Proliferations-treibender Mechanismen zum HRS-Phänotyp führen (Bräuninger et al., 2006). Zu den aberrant-ausgeprägten Signalmolekülen und TF gehören Notch-1, verschiedene Rezeptor-Tyrosin-Kinasen, die PI3K- und MEK/ERK-Signalwege sowie STAT-3, -5, -6, AP-1 und GATA3 (Dutton et al., 2005; Jundt et al., 2002a; Kube et al., 2001; Küppers et al., 2003; Mathas et al., 2002; Renne et al., 2005; Skinnider et al., 2002; Zheng et al., 2003).

Bei der Rettung der prä-apoptotischen HRS-Vorläuferzellen im GC spielt voraussichtlich die konstitutive NF- κ B-Aktivierung eine tragende Rolle. NF- κ B aktiviert z.B. die Expression des anti-apoptotischen DISC (engl. death-inducing signalling complex)-Inhibitors cFLIP und induziert die Expression pro-inflammatorischer Zytokine (Dutton et al., 2004; Hinz et al., 2002; Kreuz et al., 2001). In einigen Fällen konnten genetische Aberrationen in den Genen für I κ B α und I κ B ϵ , die die NF- κ B-Retention im Zytoplasma verhindern und somit zur NF- κ B-Aktivierung beitragen, in HRS-Zellen nachgewiesen werden (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Jungnickel et al., 2000). Ein konstitutives NF- κ B-Signal kann jedoch auch von EBV induziert werden. Ca. 40% der klassischen HL-Fälle sind EBV-positiv (Küppers, 2003). Indizien für eine Rolle von EBV bei der HL-Pathogenese sind u.a. das Auffinden und die Klonalität von EBV in allen HRS-Zellen EBV-positiver HL-Fälle und das Verbleiben in diesen während des gesamten Krankheitsverlaufs (Brousset et al., 1994; Weiss et al., 1989). Desweiteren weisen Menschen, die an IM erkrankt waren, ein erhöhtes Risiko auf, ein HL zu entwickeln (Hjalgrim et al., 2003).

1.3.3 Post-Transplantations-lymphoproliferative Erkrankungen

Die Post-Transplantations-lymphoproliferativen Erkrankungen (engl. post transplantation lymphoproliferative disorders, PTLD) sind vorwiegend GC-B-Zell-Lymphome und entstehen in Patienten, die ein Organ oder eine allogene Knochenmarktransplantation (KMT) erhalten haben (Küppers, 2003). Anhand der Ausprägung des GC-Markers BCL-6 bzw. der Plasmazell-Marker MUM-1 und CD138 lassen sich die PTLD in drei verschiedenen Subtypen einordnen. Der erste Subtyp umfasst die zentroblastischen DLBCL und BL mit einem Immunphänotyp von BCL-6⁺, MUM1^{+/+}, CD138⁻. Der zweite Subtyp beschreibt die meisten polymorphen PTLD- und einige DLBCL-Fälle mit einem Immunphänotyp von BCL-6⁻, MUM1⁺, CD138⁻ und der dritte umfasst einige polymorphe PTLD und die immunoblastischen DLBCLs mit einem Immunphänotyp von BCL-6⁻, MUM1⁺, CD138⁺ (Capello et al., 2005).

Das Risiko, ein PTLD zu entwickeln, ist durch die Transplantations-assoziierte Immunsuppression der Patienten bedingt und abhängig von der Art des Transplantates, dem Alter und des EBV-Status der Patienten (Capello et al., 2005). EBV⁻ Patienten tragen ein um 20-fach erhöhtes Risiko, ein B-Zell-Lymphom zu entwickeln (Ho et al., 1985). Nahezu alle der PTLD B-Zell-Lymphome sind EBV-positiv (Küppers, 2003). Die Immunsuppression der Patienten stört das Gleichgewicht zwischen den EBV⁺ B-Zellen und den EBV-spezifischen T-Zellen, so dass EBV⁺ B-Zellen in der Latenz III nicht mehr durch T-Zellen kontrolliert und zerstört werden können. Diese Latenz III-ausprägenden B-Zellen können ungehindert expandieren und sich nach einer zunächst poly- und/oder oligoklonalen Phase durch vermutlich weitere Transformationsereignisse zu einem monoklonalen Tumor entwickeln (Knowles, 1998). Das Latenzstadium III von EBV zeigt sich vorwiegend in den immunoblastischen DLBCL und polymorphen PTLD (Brink et al., 1997). Genetische Aberrationen im PTLD umfassen z.B. p53-Mutationen, die die Transaktivatorfunktion von p53 inhibieren, und durch aberrante SHM-eingeführte Mutationen in den Genen für Pim-1, PAX5, RhoH/TTF und c-Myc in einem Teil der Post-Transplantations DLBCL (Capello et al., 2005; Cerri et al., 2004).

Wie in 25% der HL-Fälle wurden auch in einigen PTLD-Fällen BCR-destruktive Mutationen in rearrangierten V-Genomordnungen gefunden (Bräuninger et al., 2003; Capello et al., 2003; Timms et al., 2003). BCR-destruktive Mutationen entstehen während der GC-Reaktion, so dass das Auffinden solcher Mutationen in HL- und PTLD-Fällen nicht nur stark auf einen Ursprung des jeweiligen Tumorklons von prä-apoptotischen GC-B-Zellen hindeutet, sondern auch auf ein Transformationsereignis, dass Rezeptor-losen B-Zellen ermöglicht, in der Peripherie zu überleben. Dieses Transformationsereignis ist vermutlich eine EBV-Infektion.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Assoziation des EBV mit den Burkitt-, Hodgkin- und PTLD-Lymphomen sowie das Auffinden des viralen Genoms in jeder Tumorzelle der EBV⁺ Fälle deutet auf eine wichtige Rolle der EBV-Infektion in der frühen Lymphompathogenese hin. Desweiteren entstehen EBV⁺ HL und PTLD-Lymphome oft aus Zellen, in denen die SHM im GC zum Verlust des ursprünglich funktionellen BCR geführt hat (Bräuninger et al., 2006). Die Ausprägung des BCR-imitierenden LMP2A könnte für die Rettung der BCR-losten HL- und PTLD-Vorläuferzellen vor der Apoptose verantwortlich sein, da z.B. die LMP2A-Transgen-Ausprägung in der Maus BCR-losten B-Zellen ein Überleben in der Peripherie ermöglicht (Caldwell et al., 1998; Casola et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob im Rahmen einer In-Vitro-EBV-Infektion tatsächlich auch humane GC-B-Zellen und insbesondere BCR-defiziente GC-B-Zellen durch EBV vor der Apoptose gerettet und in LCLs (GC-LCLs) transformiert werden können. Dieser Nachweis wäre ein weiterer Hinweis darauf, dass EBV an der Entstehung des HL und PTLD eine maßgebliche Rolle spielt. GC-LCLs stellen zudem wichtige In-Vitro-Modelle dar, um den Einfluss von EBV auf GC-B-Zellen zu analysieren und um die transformierenden Eigenschaften des Virus im Hinblick auf die Lymphompathogenese zu enthüllen. Zusätzlich zu den GC-LCLs werden LCLs aus naiven B-Zellen (N-LCLs) etabliert, um spezifisch den Einfluss von EBV auf GC- versus naive B-Zellen zu untersuchen und direkt mit molekularen Mustern von HL und PTLD-Lymphomen zu vergleichen. Im Fokus des Vergleichs stehen daher Marker unterschiedlicher B-Zell-Differenzierungsstadien sowie Marker, die im HL aberrant ausgeprägt werden. Da eine fehlgerichtete AID-Aktivität in Verdacht steht, die maligne Transformation von B-Zellen zu fördern (Pasqualucci et al., 2001), wird zudem der Einfluss von EBV auf die SHM-Aktivität in den transformierten GC- und naiven B-Zellen untersucht.

Die Teilnahme EBV-infizierter B-Zellen an der GC-Reaktion wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Es wird einerseits angenommen, dass EBV zur Etablierung der viralen Persistenz die B-Zell-Differenzierungsstadien ausnutzt. Andererseits deutet vieles darauf hin, dass EBV-infizierte B-Zellen an der GC-Reaktion nicht mehr teilnehmen können. In dieser Arbeit wird daher versucht, eine Methode zu etablieren, die es erstmals ermöglicht, die seltenen (ca. 1-10 in 10⁶ B-Zellen) latent-EBV-infizierten B-Zellen aus dem PB gesunder Blutspender zu isolieren und auf Spuren einer vorrausgegangenen GC-Reaktion zu analysieren. Die Anwendung dieser Methode kann wichtige neue Erkenntnisse der normalen EBV-Infektion im Hinblick auf die Persistenz-Entwicklung geben und zudem Hinweise liefern, warum EBV in seltenen Fällen zu der Entstehung von B-Zell-Lymphomen führt.

2. Material und Methoden

2.1 Isolierung von BCR-defizienten GC- und naiven B-Zellen aus dem Blut

Humane GC-B-Zellen wurden nach Aufklärung und schriftlicher Einverständnis der Patienten aus Tonsillen einer Routine-Tonsillektomie isoliert. Zur Aufreinigung von tonsillären mononukleären Zellen (englisch: tonsillar mononuclear cells, TMC) wurde zunächst das Tonsillen-Gewebe mit einem Skalpell geschreddert. Gewebsreste wurden über ein Sieb abgetrennt. Mononukleäre Zellen aus dem PB (englisch: peripheral blood mononuclear cells, PBMC) zur Isolierung naiver B-Zellen wurden aus Leukozytenangereicherten Blut-Präparaten (engl. buffy coats, BC) isoliert. Die weitere Aufreinigung der TMC und PBMC erfolgte durch eine Ficoll-Dichte-Gradienten Zentrifugation (Amersham, Freiburg, Germany). GC- und naive B-Zellen wurden danach durch magnetische Zellseparation (englisch: magnetic associated cell separation, MACS) isoliert. Hierfür wurden die TMC 10 Min. mit 50 µl anti-CD77-FITC (Becton Dickinson, BD, Heidelberg, Germany) pro 1×10^8 Zellen in einem Puffervolumen von 400 µl PBS/BSA 0,5% gefärbt und mit PBS/BSA 0,5% gewaschen. Danach wurden die TMC 20 Min. mit 1/5 Volumen (Vol) anti-FITC-Microbeads (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) inkubiert, gewaschen und die GC-B-Zellen über LS-MACS-Säulen isoliert. Um einer Apoptose der fragilen GC-B-Zellen zu vermeiden, wurden die Magnete, Säulen und Puffer bei 4°C vorgekühlt und alle Aufreinigungsschritte auf Eis durchgeführt.

Naive B-Zellen wurden isoliert, indem man zunächst andere Zellpopulationen wie Gedächtnis-B-Zellen, einige T und NK Zellen mit CD27-Microbeads (Miltenyi Biotec) und Monozyten mit CD11b-Microbeads (Miltenyi Biotec) färbt und über MACS-Säulen abreinigt. Übrig gebliebene CD27-positive Zellen wurden in einem zweiten CD27-Microbeads Färbe- und Abreinigungsschritt entfernt. Die Anfärbung der CD27-positiven und der CD11b-positiven Zellen erfolgte mit einem 1/1 Vol CD27-Microbeads bzw. einem 1/5 Vol CD11b-Microbeads über 20 Min. bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen im Durchlauf mit einem 1/10 Vol CD19-Microbeads (Miltenyi Biotec) gefärbt und die naiven B-Zellen über zwei konsekutive positive MACS-Aufreinigungen isoliert.

2.2 In-Vitro-Infektion mit EBV und Etablierung von GC- und N-LCLs

Die EBV-Infektion der GC- und naiven B-Zellen erfolgte mit 5 ml Überstand der Marmoset Zelllinie B95-8 pro 10^7 B-Zellen. 24 Std. nach der Infektion werden die Zellen mit einer Verdünnung von jeweils 50, 100, 500 und 10^3 GC-B-Zellen pro Fach oder 10, 50, 100 und 500 naive B-Zellen pro Fach auf 96er-Mikrotiterplatten ausplattiert. Die Ausplattierung erfolgte in jeweils 100 µl entweder 100% LCL-Zellkulturüberstand einer Zelllinie, die 24

Std. vorher 1:2 mit frischem RPMI 1640 Glutamax-1 Medium (Standardmedium; Gibco, Karlsruhe, Germany) verdünnt wurde, (naive und GC-B-Zellen) oder in 100 µl frischem Medium auf einer Schicht autologer Fütterzellen (GC-B-Zellen). LCL-Zellkulturüberstand erhöht die Effizienz der Klonierung durch die Bereitstellung von parakrinen Wachstumsfaktoren ohne dabei das präferentielle Auswachsen einer bestimmten B-Zellpopulation zu fördern (Mevissen et al., 1993). Die Zellen wurden vor Bestimmung der Zellzahl und der Aussaat sorgfältig resuspendiert, um zu vermeiden, dass Zellklumpen eine korrekte Verdünnungsreihe behindern. Auswachsende Zellklone wurden zwei bis vier Wochen nach EBV-Infektion in 24er-Mikrotiterplatten umgesetzt. Einige zusätzliche monoklonale Zelllinien wurden durch Einzelzell-Klonierung von Zellen, die bereits zwei bis drei Wochen als polyklonale Zelllinien gewachsen waren, etabliert. Die polyklonalen Zelllinien wurden zu diesem Zweck mit jeweils 0,5, 1, 2 und 10 Zellen pro Fach auf 96er-Mikrotiterplatten in 100 µl eigenen 100% LCL-Zellkulturüberstand ausgesäht. Nicht-infizierte GC- und naive B-Zellen wurden als Kontrolle für das Auswachsen in vivo EBV-infizierter B-Zellen mit jeweils 10^3 Zellen pro Fach auf 96er-Mikrotiterplatten ausgesäht (s.o.). Aus diesen Kontrollen sind nie Zellklone ausgewachsen.

2.3 Herstellung autologer Fütterzellen

Autologe Fütterzellen wurden aus den entsprechenden Tonsillen durch eine 30 Min. Inkubation der TMC mit 50 µg/ml Mitomycin bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt im Brutschrank hergestellt (Irsch, 1996). Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und in Cyclosporin A (50 mg/ml, Sigma Aldrich, Hamburg)-enthaltenden Standardmedium resuspendiert. Eine 96er-Mikrotiterplatte mit Fütterzellen, aber ohne Zugabe isolierter B-Zellen wurde zur Bestätigung angelegt, dass die Mitomycin- und Cyclosporin A-behandelten Fütterzellen sich nicht weiter teilen konnten.

2.4 Zellkultur

Die Marmoset B95-8 Zelllinie wurde zur EBV-Produktion verwendet. BL41 und BL2 sind BL-Zelllinien. L428 ist eine Hodgkin-Zelllinie. LCL 940410, LCL 031006, LCL 030515, LCL 970402 und IMEBV sind LCLs aus dem PB (PB-LCLs) von gesunden Spendern. Die Kultivierung aller humanen Zelllinien, ausser der Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa, fand in Standardmedium versetzt mit 10% FCS und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt (Standardbedingungen) im Brutschrank statt. Die Kultivierung der HeLa-Zelllinie fand in DMEM-Medium versetzt mit 10% FCS und 100 Einheiten/ml Penicillin sowie 100 µg/ml Streptomycin unter Standardbedingungen statt. Die

in 96er-Mikrotiterplatten ausgesähten Zellklone wurden beim Transfer in eine 24er-Mikrotiterplatte 1:1 mit Standardmedium verdünnt und anschließend nur bei Medium-Verfärbung gefüttert. Alle stabilen LCLs wurden bei einer Zelldichte von 5×10^5 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml kultiviert.

2.5 PCR-Analysen

Die Sequenzen aller Oligonukleotide (engl. Primer) der hier durchgeführten PCRs befinden sich im Anhang in Tabelle A1.

2.5.1 V-Gen-PCR

Die Klonalitätsbestimmung der hier etablierten GC- und N-LCLs sowie die Analyse der Zelllinien auf die Merkmale der SHM wurde mit Hilfe der V_H -, V_{HL} -, V_K -, V_{KL} - und V_λ -Genfamilien-spezifischen PCRs durchgeführt. V_{HL} - und V_{KL} -Genumlagerungen wurden durch eine Kombination von Primern, die in der Gensequenz für die Leitpeptide der V_H - und V_K -Ig-Ketten binden, mit Primermischungen der entsprechenden J-Gensegmente detektiert. V_H -, V_K - und V_λ -Genfragmente hingegen wurden durch eine Kombination von Genfamilien-spezifischen Primern, die die Gerüstregion I (engl. Framework region, FR I) im V-Gen erkennen, mit Primermischungen der entsprechenden J-Gensegmente amplifiziert. Die verwendeten Primer binden an fast alle vorhandenen sowie an die am häufigsten verwendeten V-Gensegmente und an alle der vorhandenen J-Gensegmente, so dass die meisten der möglichen $V_H D_H J_H$ - und $V_L J_L$ -Genumlagerungen durch die PCRs vervielfältigt und somit detektiert werden können. Die V_{HL} -PCR-Produkte sind zwischen 500 und 550 bp, die V_{KL} - zwischen 500 bis 850 bp und die $V_H D_H J_H$ - und $V_L J_L$ -PCR Produkte zwischen 300 und 350 bp lang. Bei der Suche nach BCR-destruktiven V-Genmutationen in den LCLs wurden in der Einrunden-PCR zur Amplifikation eines längeren DNA-Fragmentes der $V_H D_H J_H$ - und $V_L J_L$ -Genumlagerungen die $3'J_H$ -, $3'J_K$ - und $3'J_\lambda$ -Primermischungen verwendet.

Protokolle der V-Gen-PCRs

Die $MgCl_2$ -Konzentrationen und Hybridisierungs-Temperaturen beziehen sich auf die jeweiligen Vorwärts-Primer und die entsprechenden Rückwärts-Primermischungen ($3'J_H$: $3'J_H1.2.4.5$, $3'J_H3$, $3'J_H6$ oder $3'J_K$: $3'J_K1.2.4$, $3'J_K3$, $3'J_K5$ oder $3'J_\lambda$: $3'J_\lambda1$, $3'J_\lambda2.3$, $3'J_\lambda6.7$) (Bräuninger et al., 1999; Klein et al., 1995; Küppers et al., 1993; Müschen et al., 2001).

MgCl₂-Konzentration: 1,5 mM (V_H2-6, V_HL1 und V_HL5, V_λ1-4 und V_λ6-9)
2 mM (V_HL2-4, V_KL1-4)
2,5 mM (V_H1, V_K1-6)

Hybridisierungs-Temperatur: 61°C (V_H1-6, V_K1-6, V_KL1-4);
63°C (V_HL1-5, V_λ1-4 und V_λ6-9)

PCR-Ansatz: 4 µl dNTPs (2 mM)
4 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Fermentas, St. Leon-Rot)
2 µl V_H-, V_HL-, V_K-, V_KL- bzw. V_λ-Genprimer (2,5 µM)
2 µl 3'J_H-, 3'J_K- bzw. 3'J_λ-Genprimer-Mixe (2,5 µM)
2,4 µl, 3,2 µl bzw. 4 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
add 38,7 µl H₂O
+ 1 µl DNA (ca. 100 ng)
+ 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)

PCR-Programme: 95°C 5 Min., 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35 x (95°C 50 Sek., 61°C oder 63°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

2.5.2 V-Gen- und EBNA1-Einzelzell-PCR

Vor der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus einer Zelle wurde ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. 1 µl Proteinase K (0,25 g/l PCR grade, Roche, Mannheim) wurde zu der in 20 µl High Fidelity-Puffer isolierten Zelle pipettiert. Während dieser 2- (Hydraulische Mikrodisektion) bis 4-stündigen (Laser Mikrodisektion) Inkubation der Zelle bei 55°C werden DNA-bindende Proteine bzw. das BSA der bemantelten PCR-Reaktionsgefäße der Laser-Mikrodisektion abgebaut. Im Anschluss an die Inkubation wurde die Proteinase K 10 Min. bei 99°C inaktiviert. In der Einzelzell-PCR sollen möglichst viele der vorhandenen jedoch unbekannten V-Genumlagerungen sowie zur Validierung der EBV-Infektion der Einzelzellen ein Fragment des EBNA1-Gens vervielfältigt werden. Zu diesem Zweck wurden in der ersten Runde 31 (bei Verwendung der V_HL-Primer) bzw. 32 (bei Verwendung der V_H Primer) Primer gemeinsam verwendet. In der zweiten Runde wurden voramplifizierte DNA-Fragmente in unterschiedlichen, familienspezifischen PCR-Reaktionen mit stromaufwärts-liegenden Rückwärts-Primern („seminested PCR“) weiter vervielfältigt. Die stromaufwärts-liegenden Rückwärts-Primer der zweiten Runde verhindern weitestgehend eine gleichzeitige Vervielfältigung von unspezifischen DNA-Fragmenten. In der ersten Runde werden zur Kontrolle der PCR immer parallel Einzelzellen von monoklonalen GC-

LCLs mit bekannten $V_H D_H J_H$ - bzw. $V_L J_L$ -Genumlagerungen amplifiziert. Diese Zellen wurden im Vorfeld mit dem FACS-Diva in jeweils einzelne Reaktionsgefäße sortiert.

Primer der 1. Runde (Tabelle 1)

3'V_HL Primer-Mischung:

V_HL1, V_HL2, V_HL3, V_HL4, V_HL5, 3'J_H1.2.4.5, 3'J_H3, 3'J_H6 (je Primer 1 µM) oder

3'V_H Primer-Mischung:

V_H1, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6, 3'J_H1.2.4.5, 3'J_H3, 3'J_H6 (je Primer 1 µM) und

3'V_λ Primer-Mischung:

V_λ1, V_λ2, V_λ3A, V_λ3B, V_λ4, V_λ6, V_λ7, V_λ8, V_λ9, 3'J_λ1, 3'J_λ2.3, 3'J_λ6.7 (je Primer 1 µM)
und

3'V_κ Primer-Mischung:

V_κ1, V_κ2, V_κ3, V_κ4, V_κ5, V_κ6, 3'J_κ1.2.4, 3'J_κ3, 3'J_κ5 (je Primer 1 µM) und

EBNA1F (2,5 µM) und EBNA1R1 (2,5 µM)

PCR-Ansatz der 1. Runde:

5 µl dNTPs (2 mM)

3 µl 10 x PCR-Puffer (High Fidelity mit MgCl₂, Roche)

je 2,5 µl 3'V_H- (oder 3'V_HL-), 3'V_κ- und 3'V_λ-Genprimer-Mischungen (1 µM)

je 2,5 µl EBNA1F- und EBNA1R1-Genprimer (2,5 µM)

2,2 µl MgCl₂ (25 mM, High Fidelity, Roche; MgCl₂-Endkonzentration 2 mM)

add 28,7 µl H₂O

+ 21 µl gepickte Zelle inklusive Proteinase K

+ 0,3 µl High Fidelity-DNA-Polymerase (Roche)

PCR-Programm der 1. Runde: 95°C 3 Min., 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min.

35 x (95°C 50 Sek., 61°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

Primer der 2. Runden

Es ändern sich nur die Rückwärts-Primer. Anstelle der 3'J_H-, 3'J_κ- und 3'J_λ-Primer bzw. des EBNA1-R1-Primers werden die 5'J_H-, 5'J_κ- und 5'J_λ-Primer bzw. wird der EBNA1-R2-Primer verwendet (siehe Tabelle 1). Die Längen der PCR-Produkte liegen bei 300-350 bp für die V_H- und V_L-PCRs, bei 316 bp für die EBNA1-PCR und bei 500-550 bp für die V_HL-PCRs.

PCR-Bedingungen für die 2. Runde:

45 Zyklen; 1 µl der 1. Runde dient als Schablone für die getrennte, familienspezifische Amplifikation der jeweiligen V_H -, V_{HL} -, V_λ -, V_κ -Genumordnungen bzw. des EBNA1-Gens. PCR-Programme und Ansatz der PCR-Mischungen für V_H -, V_{HL} -, V_λ - und V_κ -Genumordnungen siehe V-Gen-PCR. Die PCR-Bedingungen für die 2. Runde der EBNA1-Amplifikation entsprechen den V_{H2-6} - und $V_{\kappa1-6}$ -V-Gen-PCRs.

2.5.3 D_H -PCR

$D_H J_H$ -Genumlagerungen sowie ein Fragment, das als Indiz einer nicht-umgelagerten Keimbahnkonfiguration des IgH-Genlokus dient, werden durch sieben D_H Genfamilien-spezifische Primer in Kombination mit der o.g. 3' J_H -Genprimer-Mischung detektiert.

Protokoll der D_H -Gen-PCRs

Die $MgCl_2$ -Konzentrationen und Hybridisierungs-Temperaturen beziehen sich auf die jeweiligen Vorwärts-Primer und die entsprechende 3' J_H -Rückwärts-Primer-Mischung (3' $J_{H1.2.4.5}$, 3' J_{H3} , 3' J_{H6}) (Küppers et al., 1993; Müschen et al., 2000a).

$MgCl_2$ -Konzentration: 1 mM (D_{H1} und D_{H6}),
1,5 mM (D_{H2-4} , D_{H5} und D_{H7-27})

Hybridisierungs-Temperatur: 57°C (D_{H1} , D_{H3} , D_{H5-7})
59°C (D_{H2} und D_{H4})

PCR-Ansatz: 4 µl dNTPs (2 mM)
4 µl 10 x PCR-Puffer (Fermentas)
2 µl D_H -Genprimer (2,5 µM)
2 µl 3' J_H -Genprimer Mixe (2,5 µM)
1,6 µl bzw. 2,4 µl $MgCl_2$ (25 mM, Fermentas)
add 38,7 µl H_2O
+ 1 µl DNA (ca. 100 ng)
+ 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)

PCR-Programme: 95°C 5 Min., 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 38 x (95°C 50 Sek., 57°C oder 59°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

2.5.4 LDI-PCR

Die Detektion des 2. Allels der BCR-defizienten Zelllinie GC-LCL 7-85 erfolgte durch eine LDI-PCR. Die LDI-PCR ermöglicht es in einen unbekannten Bereich zu sequenzieren. Hierbei ist die Primer-nahe Restriktionsschnittstelle eines entsprechenden DNA-Abschnittes bekannt, weitere Schnittstellen sind jedoch unbekannt. Für den Restriktionsverdau werden jeweils 5 ng DNA der Zelllinie mit 1 µl Restriktionspuffer und 0,3 µl Restriktionsenzym *Pae* I, *Mun* I oder *Xba* (Fermentas) versetzt, mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt und 2 Std. bei 37°C inkubiert. Die Restriktionsverdau werden anschließend in 1 x Ligationspuffer und mit 0,4 µl der T4-Ligase (Promega, Mannheim) über Nacht bei 4°C ligiert. Die Fällung erfolgte mit 1 µl see-DNA (Amersham), 0,5 ml Glykogen (20 mg/ml), 1/10 Vol NaAc und 1 Vol Isopropanol 10 Min. bei 250 g und einem sich anschließenden Waschschrift mit 200 µl 70% Ethanol 5 Min. bei 250 g. Die ligierten, gefällten DNA-Fragmente werden in 10 µl Tris HCl gelöst und der unbekannte DNA-Bereich in einer 2 Runden-PCR mit J_H-LDI-spezifischen Primern (Tabelle 1) amplifiziert.

Ansatz der 1. Runde: 0,6 µl dNTPs (je 2,5 mM)

0,6 µl Mg(OAc)₂ (25 mM)

0,6 µl JH *Pae* ex for oder JH *Mun* ex for oder JH *Xba* ex for (10 µM)

0,6 µl JH6 II ex rev (10 µM)

8,3 µl H₂O

9 µl 3,3 x rTth-Puffer

10 µl Ligationsansatz

0,3 µl rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/µl) (Applied Biosystems)

PCR-Programm der 1. Runde: 95°C 3:30 Min., 85°C Pause (Enzymzugabe), 35 Zyklen (95°C 45 Sek., 66°C 45 Sek., 68°C 8 Min.), 72°C 15 Min., 10°C Pause

Ansatz der 2. Runde: 0,6 µl dNTPs (je 2,5 mM)

0,6 µl Mg(OAc)₂ (25 mM)

0,6 µl JH *Pae* int for oder JH *Mun* int for oder JH *Xba* int for (10 µM)

0,6 µl JH6 II int rev (10 µM)

16,3 µl H₂O

9 µl 3,3 x rTth-Puffer

2 µl des 1. Rundenproduktes

0,3 µl rTth-DNA-Polymerase XL (2 U/µl) (Applied Biosystems)

PCR-Programm der 2. Runde: 95°C 3:30 Min., 85°C Pause (Enzymzugabe), 45 Zyklen (95°C 30 Sek., 64°C 30 Sek., 68°C 8 Min.), 72°C 15 Min., 10°C Pause

2.5.5 EBV-PCR

Um festzustellen, ob es sich bei den etablierten GC- und N-LCLs um spontan auswachsende in vivo EBV-infizierte Zellen oder in vitro EBV-infizierte Zellen handelt, wird ein Fragment des LF2-EBV-Gens (Acc. Nr. M35547; 9388-9725 bp) mittels PCR amplifiziert. Dieses Fragment ist Teil einer Deletion in der EBV-Variante der B95-8 Zelllinie, so dass es bei dieser PCR nur ein Produkt gibt, wenn es sich beim EBV-Genom um das eines Wildtyps und somit um eine in vivo EBV-Infektion handelt. Eine in vitro EBV-Infektion primärer GC- und naiver B-Zellen mit dem B95-8 EBV hingegen führt zu keinem PCR-Produkt. Diese Einrunden-PCR wurde mit DNA einer IM-Tonsille positiv kontrolliert.

Zusätzlich zu diesem indirekten Nachweis der in vitro EBV-Infektion wird die LF2-PCR bei der limitierenden Verdünnungsreihe zur statistischen Auswertung der Frequenz EBV-positiver B-Zellen im PB von gesunden Blutspendern angewandt (Zweirunden-Protokoll, 1. und 2. Runde). Diese insgesamt 65 Zyklen umfassende Endpunkt-PCR ergibt ein Produkt, sofern auch nur eine B-Zelle unter den zu untersuchenden 5×10^4 bis 5×10^5 B-Zellen EBV-positiv ist. Das amplifizierte PCR-Produkt ist 337 bp lang.

PCR-Ansatz der 1. Runde: 3 µl dNTPs (2 mM)
3 µl 10 x PCR-Puffer (Fermentas ohne MgCl₂)
je 1,5 µl EBV F (2,5 µM)
je 1,5 µl EBV R1 (2,5 µM)
2,4 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)
add 20 µl H₂O

+ 10 µl DNA (125 ng - 6,25 µg)

PCR-Programm der 1. Runde: 95°C 5 Min., 30 x (95°C 50 Sek., 60°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

PCR-Ansatz der 2. Runde: 4 µl dNTPs (2 mM)
4 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Fermentas)
2 µl EBV F (2,5 µM)
2 µl EBV R2 (2,5 µM)

3,2 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)

add 38,7 µl H₂O

+ 1 µl der 1. Runde (bzw. ca. 100 ng DNA beim Einrunden-Protokoll)

+ 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)

PCR-Programm der 2. Runde

95°C 4 Min., 68°C Pause (Enzymzugabe), 72°C 1 Min., 35 x (95°C 50 Sek., 58°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

2.6 Klonierung von V_H-PCR-Produkten und Analyse von V_H-Genmutationen

Eine fortlaufende schwache SHM in monoklonalen Zelllinien wird in der Regel durch die allen Zellen einer Linie gemeine V_HD_HJ_H-Gensequenz im Sequenzbild überlagert und lässt sich nur feststellen, indem einzelne PCR-Produkte in ein Plasmid kloniert, amplifiziert und sequenziert werden. Diese einzelnen PCR-Produkte spiegeln dabei den Mutationsstatus einzelner Zellen dieser Linie wider. Bei einer stärkeren SHM ließe sich anhand mehrerer klonierter Sequenzen ein genealogischer Baum erstellen. Die V_HD_HJ_H-Genumordnungen der monoklonalen LCLs wurden mittels V-Gen-PCR unter Verwendung der High Fidelity-Polymerase (Roche), die eine nur geringe Fehlerrate ($8,3 \times 10^{-6}$ /bp/Zyklus) aufweist, amplifiziert (Frey und Suppmann, 1995). Die Länge der V_H-FR I-PCR-Produkte von den monoklonalen LCLs variierte zwischen 240 und 465 bp, mit der Ausnahme der GC-LCL 5-7-1, in der, verursacht durch eine Deletion in FR III, nur ein V_H-Fragment von 127 bp amplifiziert wurde. Die Anzahl der erwarteten DNA-Polymerase-Fehler wurde mit folgender Formel bestimmt: Anzahl der sequenzierten bp x Anzahl der PCR-Zyklen x Fehlerrate der DNA-Polymerase.

Der kommerzielle Plasmidvektor pGEM-Teasy (Promega) hat eine Ampicillin (Amp)-Resistenz und liegt durch einen T-Überhang linearisiert vor. Durch das Anhängen eines Adenin (A)-Überhangs mit der Taq-DNA-Polymerase (20 Min. 72°C Inkubation) können die PCR-Produkte (Insert) in den Vektor ligiert werden. Durch diese Ligation des Inserts wird das Gen, dass die β-Galaktosidase kodiert, unterbrochen und β-Galaktose kann nicht mehr verstoffwechselt werden. Die superkompetenten XL1-Blue Bakterien (E.coli K12 Derivat, Stratagene, Heidelberg) wurden mit diesen Ligationsansätzen transformiert. Die Selektion auf einzelne Bakterienkolonien erfolgte auf LB-Amp-Agar-Platten. Durch LB-Amp-Schüttelkulturen wurden einzelne Bakterienkulturen vermehrt und die Plasmid-DNA wurde mit kommerziellen Kits (Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld) isoliert. Die Sequenz der PCR-Produkte wurde durch Sequenzierungen überprüft. Die Menge des zu

verwendeten PCR-Produktes für die Ligation richtet sich nach der Formel:

$$\text{ng Insert} = 50 \text{ ng Vektor} \times X \text{ kb Insert} \times 3 / 3 \text{ kb Vektor}$$

z.B. 17,5 ng für V_HD_HJ_H-Genrearrangements von 350 bp Länge:

$$\text{ng Insert} = 50 \text{ ng Vektor} \times 0,35 \text{ bp V}_{\text{H}}\text{D}_{\text{H}}\text{J}_{\text{H}} \times 3 / 3 \text{ kb Vektor}$$

2.6.1 A-Anhang

Das Anhängen eines A-Überhanges an die entsprechende Menge PCR-Produkt fand durch die Taq-DNA-Polymerase 20 Min. bei 72°C statt. Danach wurde die Reaktion mit Ethanol gefällt und die DNA in 3 µl Tris (10 mM) aufgenommen.

2.6.2 Ligation

Die Ligation fand bei 4°C über Nacht statt.

Ligationsansatz:

- 5 µl Ligationspuffer
- + 1 µl pGEM Teasy Vektor
- + 3 µl Insert
- + 1 µl T4-Ligase

2.6.3 Transformation

Die XL-Blue Bakterien wurden 7 Min. auf Eis aufgetaut. Es wurden jeweils 2 µl eines Ligationsansatzes zu 40 µl Bakteriensuspension pipettiert und die Mischung 30 Min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Transformationsansätze für exakt 30 Sek. bei 42°C geschockt und direkt wieder 2 Min. auf Eis inkubiert. Die transformierten Bakterien wurden dann mit 450 µl SOC-Medium (Super-optimales Brühe Medium, versetzt mit 20 mM Glucose, Invitrogen GmbH) versorgt und vor dem Ausstrich auf LB-Amp-Agar Platten (100 µg/ml Ampicillin, Gibco) 60 Min. bei 37°C geschüttelt. Die LB-Amp-Agar-Platten wurden vor dem Ausstrich der Bakterien mit 100 µl Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (0,1 M, Sigma Aldrich) und 50 µl β-Galaktose (20 mg/ml, Fermentas) behandelt. In blauen Bakterienklonen wurden die Plasmid-Vektoren ohne Insert re-ligiert und β-Galaktose kann wieder verstoffwechselt werden. Bakterienklone, die nach dem Ausstrich und der Über-Nacht-Inkubation bei 37°C nicht blau wurden, hatten das Insert in den Vektor ligiert. Einzelne dieser weissen Bakterienklone wurden amplifiziert und sequenziert.

2.7 Sequenzanalyse

Die PCR-Produkte wurden über eine Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Banden der PCR-Produkte aus dem Gel ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente

erfolgte mit QiaEx II, Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden). Plasmid-DNA mit V_H-PCR-Produkten wurde mit 1 µl direkt in die Sequenzreaktion eingesetzt. Die Sequenzierung verlief nach einem modifizierten Protokoll der Sequenziermethode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzreaktion enthielt neben den normalen dNTPs Fluoreszenzfarbstoff-markierte Dideoxy-Nukleosid-Triphosphate, die bei zufälligem Einbau in den DNA-Strang zu einem Abbruch der Strang-Synthese führen. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente wurden dann mit dem ABI 3130 (Applied Biosystems, Darmstadt) Sequenzierer gemessen. Die Sequenzen wurden mit dem DNASIS-Programm (Pharmacia), der IMGT-Datenbank (<http://imgt.cines.fr/cgi-bin/IMGtdnap.jv?livret=0&Option=humanIg>) sowie der Blast-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov:80/blast/>) ausgewertet und mit einer Labor-eigenen Datenbank aller intern erstellten V-Gensequenzen kontrolliert.

Sequenzreaktion:

0,75 µl Primer (2,5 µM), 3 ng DNA, 3,5 µl Big Dye Sequenzierpuffer und 1 µl Big Dye des Big Dye Desoxy Terminator Ready Reaction Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems) add 20 µl H₂O.

2.8 Immunfärbungen

Eine Immunfärbung beruht auf dem Prinzip, dass zunächst ein Primär-AK an ein spezifisches, zelluläres Antigen bindet. Dieser Primär-AK ist entweder direkt mit einem Fluoreszenz-Farbstoff gekoppelt (siehe FACS-Färbungen) oder wird im nächsten Schritt von einem zweiten AK, der das Fc-Fragment des Primär-AK erkennt, gebunden. In der Regel ist dann der zweite AK mit einem Fluoreszenz-Farbstoff versehen (siehe Fluoreszenz-Färbungen auf Zytozentrifugationspräparaten).

2.8.1 Fluoreszenz-Färbungen auf Zytozentrifugationspräparaten

5 x 10⁴ Zellen der Zelllinien wurden bei 800 Umdrehungen pro Min. und der „low spin“-Einstellung für 1 Min. mittels eines Shandon-Zentrifugationsapparates (Cytospin 3) punktuell auf die Objektträger zentrifugiert. Die so entstandenen Zytozentrifugationspräparate (Zytospins) wurden über Nacht getrocknet und entweder bei -80°C eingefroren oder direkt zur Färbung verwendet. Vor der Färbung wurden die Zytospins 10 Min. in -20°C gekühlten Aceton fixiert und anschließend 20 Min. lang bei RT getrocknet. Die Zellen wurden dann entweder mit α-EBNA2, α-LMP1 oder α-BCL-6 monoklonalen Primär-AK von Dako (Tabelle 1) einer Verdünnung von 1:100 (α-EBNA2 und α-LMP1) bzw. 1:10 (α-BCL-6) für 1 Std. gefärbt. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Fluoreszenz-Farbstoff-

markierten α -Maus-IgG-Alexa 594 zweiten AK (Invitrogen GmbH) einer Verdünnung von 1:500 für 1 Std. inkubiert. Die Zellkerne wurden danach für 10 Min. mit dem Hoechst-Farbstoff 33258 (20 $\mu\text{g/ml}$, Roche) angefärbt. Die Inkubationen mit den Primär- und Sekundär-AK fanden bei RT in einer feuchten Kammer im Dunkeln statt und wurden jeweils von einem 3 x 5 Min. Waschschrift mit PBS, der die nicht-gebundenen AK bzw. Farbstoffe von den Zellen spült, abgeschlossen. Nach der Färbung wurden die Zellen in Polyvinylalkohol-Medium mit Dabko (Sigma Aldrich) unter einem Deckgläschen eingeschlossen und bis zur Analyse im Dunkeln gelagert.

2.8.2 FACS Färbungen

2.8.2.1 Oberflächen Ig-Färbungen

Magnetofluoreszente Liposomen erlauben durch eine 100-1000 fache Signalverstärkung das Auffinden selten exprimierter Oberflächenantigene (Scheffold et al., 1995). Die Primär-AK anti-Ig κ und anti-Ig λ von Becton Dickinson, Heidelberg (Tabelle 1) wurden zunächst mit Streptavidin gekoppelt (Squarix GmbH, Marl, Germany). Nach einer Vorinkubation der zu analysierenden Zellen mit 1% Polyglobulin N, um eine unspezifische Bindung der AK zu verhindern, wurden diese 10 Min. mit den 1:20 verdünnten anti-Ig κ - und anti-Ig λ -Streptavidin-gekoppelten-AK auf Eis gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Cy5-gefüllten, Biotin-gekoppelten Liposomen 30 Min. im Überkopfschüttler inkubiert, zweimal gewaschen und mit einem Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierer (FACS)-Canto (BD) analysiert. Liposomen gefärbte Zellen ohne Primär-AK dienten als Negativ-Kontrolle.

Die N-LCLs wurden mit anti-IgM-FITC- und anti-IgD-PE-AK (Tabelle 1) 10 Min. auf Eis gefärbt, gewaschen und mit einem FACS-Canto auf die Expression der Ig-Isotypen analysiert. Die Isotyp-Kontrollen entsprachen den Autofluoreszenzen der N-LCLs.

2.8.2.2 Einfach- und Zweifach- Färbungen

1×10^5 Zellen wurden mit anti-CD20-PE, anti-CD27-PE, anti-CD30-PE, anti-CD38-APC, anti-CD77-FITC bzw. mit anti-CD79b-FITC primären AK (Tabelle 1) 10 Min. auf Eis gefärbt, gewaschen und mit einem FACS-Canto analysiert. Die mittlere Fluoreszenzintensität (engl. mean fluorescent intensity, MFI) der Subpopulationen der CD30-Ausprägung in einigen Zelllinien wurde dadurch ermittelt, dass die Trennung der zwei Subpopulationen in der tiefsten Einbuchtung der zwei Histogrammpeaks vollzogen wurde. Die MFI der CD30-Ausprägung in diesen Zelllinien stellt daher nur eine Annäherung an die tatsächliche Expressionsstärke dar.

Die primären GC- und naiven B-Zellen wurden mit einer Zweifach-FACS-Färbung analysiert. CD19-MACS isolierte B-Zellen wurden hierfür zur Identifikation der naiven B-Zellen zusätzlich zu den o.g. Markern mit CD27-FITC oder CD27-PE und die GC-B-Zellen zusätzlich mit CD38-FITC oder CD38-APC angefärbt. Die Kompensation der ineinander-übergreifenden Fluoreszenz-Farbspektren für die verschiedenen AK und Farbstoffe wurde mit den jeweiligen Einzelfärbungen an CD19⁺ B-Zellen sowie der automatischen Kompensationsfunktion des FACS-Canto etabliert. Die Analyse der Marker-Expression der naiven B-Zellen wurde mit der CD27-negativen Population bzw. der GC-B-Zellen mit der CD38-stark-positiven Population durchgeführt. Die CD27-Ausprägung in naiven B-Zellen sowie die CD38-Ausprägung in GC-B-Zellen wurde durch eine Doppelfärbung mit CD27-PE und CD38-APC AK analysiert. Bei allen Zelllinien sowie bei den beiden primären Populationen wurden ebenfalls die Hintergrund-MFI der entsprechenden ungefärbten und Isotyp-Kontrollen analysiert. Alle Färbungen wurden mit identischen AK und AK-Verdünnungen durchgeführt. Die Isotyp-Kontrollen bei nahezu allen Markern, primären Zellen und Zelllinien glichen den entsprechenden Autofluoreszenzen der Zellen.

Tabelle 1. Primär- und Sekundär-AK der Immunfluoreszenz-Färbungen.

	Name	Klon oder Kat. Nr.	Spezies	Verdünnung	Kopplung	Firma
1. AK FACS	α -Ig κ	G20-193	Maus	1:20	Streptavidin	BD
	α -Ig λ	JDC-12	Maus	1:20	Streptavidin	BD
	α -IgD	IA6-2	Maus	1:10	PE	BD
	α -IgM	G20-127	Maus	1:4	FITC	BD
	α -CD20	2H7	Maus	1:3	PE	BD
	α -CD27	M-T271	Maus	1:10	FITC und PE	BD
	α -CD30	BerH8	Maus	1:10	PE	BD
	α -CD38	HIT2	Maus	1:5	APC und FITC	BD
	α -CD77	5B5	Maus	1:5	FITC	BD
	α -CD79b	N8	Maus	1:10	FITC	Dako
1. AK Zytospins	α -BCL-6	PG-B6	Maus	1:10	ungekoppelt	Dako
	α -LMP1	CS1-4	Maus	1:100	ungekoppelt	Dako
	α -EBNA2	PE2	Maus	1:100	ungekoppelt	Dako
2. AK Zytospins	α -Maus	A11032	Ziege	1:500	Alexa Fluor	Invitrogen

2.9 Quantitative RT-PCR

Die RNA der primären B-Zellen und LCLs wurde mit dem Spin Protokoll des RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden), inklusive eines zusätzlichen Säulen-DNA-Verdaus, isoliert. Die cDNA-Synthese wurde anschließend mit dem Omniscript-RT-Kit (Qiagen GmbH) durchgeführt. Die RT-PCR erfolgte in Triplikaten. Primer und FAM-markierte Sonden für C_{κ} (Hs00415042_m1), C_{μ} (Hs00383067_g1) und GAPDH (Hs99999905_m1) sind als „Assays on demand“ (Applera GmbH, Darmstadt) erhältlich. Die Expression der zwei C_{α} -Gene, der vier C_{γ} -Gene und der vier C_{λ} -Gene wurde durch „Assays on design“ (Applera GmbH, Darmstadt) bestimmt (Primersequenzen befinden sich in Tabelle A1). Die cDNA-Synthese erfolgte mit dem TaqMan-Universal-PCR-Master-Mix, No-AmpErase-UNG (Applied Biosystems) über einen 60 Sek. Denaturierungsschritt bei 95°C und sich anschließenden 45 Zyklen bestehend aus 15 Sek. bei 95°C und 60 Sek. bei 60°C. GAPDH dient als endogene Kontrolle. Als Validierung einer ähnlichen PCR-Effizienz der verschiedenen Ig- und GAPDH-RT-PCRs wurden CT-Wert-Standardkurven mit unterschiedlichen cDNA-Mengen erstellt. Die Steigung dieser Kurven betrug stets $\leq 0,1$ und bestätigte eine vergleichbare Amplifikations-Effizienz aller Assays. Die cDNA der CD19⁺ PB-B-Zellen von zwei Spendern wurde gemischt und als Kalibrator der Ig-Expression verwendet. Für den Vergleich der Transkriptionsstärken der LCLs mit denen der polyklonalen CD19⁺ B-Zellen wurden zunächst die Frequenzstärken der unterschiedlichen Ig-Isotypen sowie Ig κ und Ig λ in den CD19⁺ B-Zellen mit dem Durchflusszytometer bestimmt und die Mittelwerte von 83.5% für IgM⁺-, 9% für IgG⁺-, 7.5% für IgA⁺-, 57.5% für Ig κ ⁺- und 42.5% für Ig λ ⁺-Zellen für die Berechnungen verwendet. Kontrollen der cDNA-Synthese ohne reverse Transkriptase waren konsistent negativ.

2.10 Western-Blot-Analysen

Die Western Blot Analysen wurden unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Für den LMP2A-Blot wurden frische Proteinlysate verwendet. Die Lysate wurden bei 70°C (LMP2A) bzw. bei 99°C (AID, BCL-6, EBNA2, GATA3, LMP1, PU.1 and Syk) für 5 Min. erhitzt und die Proteine über eine SDS-8%- oder SDS-10%-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Unspezifische Protein-Bindestellen der Membranen wurden mit 4% (LMP2A), 5% (AID, Syk), 10% (BCL-6, GATA3) Milchpulver (Töpfer, Dietmannsried, Germany) oder bei PU.1, EBNA2 und LMP1 mit 2,5% Blocklösung (Roche) für 1 Std. bei RT blockiert. Anschließend wurden die Membranen gewaschen und mit den Primär-AK (Tabelle 2) über Nacht bei 4°C inkubiert. Horseradish Peroxidase-markierte Sekundär-AK wurden verdünnt (Tabelle 2) und die

Membranen für 1 Std. (BCL-6, EBNA2, GATA3, LMP1, PU.1), 2 Std. (LMP2A, Syk) oder 3 Std. (AID) mit diesen Verdünnungen bei RT inkubiert. Die Visualisierung der Proteinbanden erfolgte mit dem ECL-Plus-Detektions-Reagenz (ECL, engl. enhanced chemiluminescence, Amersham, Freiburg).

Tabelle 2. Primär- und Sekundär-AK der Western-Blot-Analysen.

	AK-Name	Klon oder Kat. Nr.	Spezies	Verdünnung	AK-Lösung
1. AK	α -AID	5G9 ^a	Ratte	1:10	5% BSA/ TBST 0,1%
	α - β Aktin	sc-1616 ^b	Ziege	1:500	5% MP/TBST 0,1% oder 0,5% Blocklösung
	α -BCL-6	BL6.02 ^c	Maus	1:300	0,5% Blocklösung
	α -GATA3	sc-268 ^b	Maus	1:100	5% MP/TBST 0,1%
	α -EBNA2	PE2 ^d	Maus	1:500	0,5% Blocklösung
	α -PU.1	sc-352 ^b	Kaninchen	1:200	0,5% Blocklösung
	α -LMP1	CS1-4 ^d	Maus	1:2000	0,5% Blocklösung
	α -LMP2A	14B7 ^e	Ratte	1:10	4% MP/TBST 0,1%
	α -Syk	Syk-01 ^f	Maus	1:2000	5% MP/TBST 0,1%
2. AK	α -Ratte	112-035-068 ^g	Ziege	1:2000	5% MP/TBST 0,1%
	α -Ziege	sc-2350 ^b	Schwein	1:10000	5% MP/TBST 0,1% oder 0,5% Blocklösung
	α -Maus	115-036-062 ^g	Ziege	1:2000	5% MP/PBST 0,1%
	α -Kaninchen	711-036-152 ^g	Esel	1:10000	0,5% Blocklösung
	α -Ratte	A9542 ^h	Esel	1:8000	4% MP/TBST 0,1%
	α -Maus	715-036-15 ^g	Esel	1:10000	5% MP/TBST 0,1%

^a Zellkultur-Überstand (Greiner et al., 2005); ^b Santa Cruz Biotech, Heidelberg; ^c Dunn Labortechnik GmbH, Asbach; ^d Dako, Hamburg; ^e Zellkultur-Überstand (Fruehling et al., 1996); ^f Abcam, Cambridge, UK; ^g Dianova, Hamburg; ^h Sigma-Aldrich, Schnelldorf

2.11 Isolierung EBV-positiver B-Zellen aus dem PB gesunder Spender

Humane PB-B-Zellen wurden aus BCs und nach Aufklärung und schriftlicher Einverständnis der Spender aus einer 500 ml Blutspende isoliert. PBMC wurden über eine Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation (Amersham, Freiburg, Germany) aufgereinigt und B-Zellen über einen CD19-MACS isoliert. Hierfür wurden die PBMC mit einem 1/10 Vol CD19-Microbeads (Miltenyi Biotec) 20 Min. bei 4°C gefärbt, anschließend mit PBS/BSA 0,5% gewaschen und die B-Zellen über LS-MACS-Säulen isoliert. Die Reinheit wurde durch eine CD20- und CD27-FACS-Färbung kontrolliert und betrug stets >98%.

2.11.1 EBER-ISH

B-Zellen wurden mit 100 µl Fixierungspuffer (4% Paraformaldehyd/5% Eisessig) pro 1×10^6 Zellen 10-20 Min. bei RT geschüttelt, anschließend 2 x mit PBS gewaschen und über Nacht bei 4°C gelagert. Vor der Hybridisierung mit der EBER-Sonde wurden die Zellen mit 500 µl Waschlösung (0,5% Tween-20 in PBS) pro 1×10^6 Zellen 10 Min. bei 56°C unter Schütteln permeabilisiert. Die Inkubation mit dem Hybridisierungspuffer: 79,5% Hybridisierungs-Lösung (10% Dextransulfat, 0,2% Sodium-Pyrophosphat, 0,2% Polyvinylpyrrolidon, 50 mM Tris/Hcl, 10 mM NaCl, 5 mM Na₂EDTA, 30% Formamid und 0,2% Ficoll in H₂O), 20% EBER-FITC-Sonde (Y 5200, Dako) und 0,5% Tween-20 mit 100 µl pro 1×10^6 Zellen erfolgte 1 Std. bei 56°C unter Schütteln im Wasserbad. Die Zellen wurden anschließend pelletiert und 10 Min. mit vorgewärmter Waschlösung (500 µl pro 1×10^6 Zellen) bei 56°C im Wasserbad gewaschen. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal für je 30 Min. wiederholt und die Zellen danach in 25 µl PBS pro 1×10^6 Zellen aufgenommen. Pro Objektträger wurden je 3×10^6 Zellen vorsichtig ausgestrichen und über Nacht bei RT getrocknet. Die Reagenzien und Puffer waren RNase-frei und alle Reaktionsschritte wurden möglichst im Dunkeln durchgeführt.

2.11.2 AP-Immunfärbung

Die Objektträger mit jeweils 3×10^6 Zellen wurden vor der Färbung 10 Min. in kaltem Aceton (-20°C) fixiert. Die Zellen wurden 20 Min. mit einer 1:50 Verdünnung Proteinase K (PNA Kit, Dako, Hamburg) in einer vorgewärmten Kammer bei 37°C inkubiert und dreimal mit TBS gewaschen. Der α-FITC-AP-AK (PNA Kit, Dako) wurde unverdünnt 30 Min. bei RT mit den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal für 3 Min. mit TBS und zweimal für 1 Min. mit H₂O auf dem Schüttler gewaschen. Die anschließende FastRed-Inkubation (BioGenex, San Ramon, Kalifornien, USA) erfolgte 30 Min. bei RT. Diese Farbreaktion wurde mit TBS gestoppt und die Zellen mit dem Mikroskop analysiert. Als Positiv-Kontrolle diente in diesem Experiment ein Zellgemisch der GC-LCL 5-7-1 mit der EBV BL41 in einem Verhältnis von 1:10³ und 1:10⁵.

2.11.3 Herstellung der EBER-Sonde durch In-Vitro-Transkription

Die EBER1- und EBER2-Gene wurden zunächst aus DNA der GC-LCL 5-7-1 mit einer Zwei-Runden-PCR amplifiziert. In der ersten Runde (Primer siehe Tabelle A1) wurde ein EBV-DNA-Fragment von 590 bp, inklusive der EBER1 und EBER2-Gene, vervielfältigt. Die Primer der zweiten Runde (Tabelle A1) befinden sich innerhalb des in der ersten Runde amplifizierten Bereichs („nested“) und tragen am 5' Ende die Promotor-Sequenzen

der RNA-Polymerasen für die In-Vitro-Transkription (IVT). Die PCR der zweiten Runde führt zur separaten Amplifikation der jeweils 210 bp langen EBER1- bzw. EBER2-Gene. In der IVT wurden anschließend die „Sense-“ und „Anti-sense“ Transkripte mit den SP6- bzw. T7-RNA-Polymerasen hergestellt. Hierbei binden die RNA-Polymerasen an die DNA-doppelsträngigen Promotoren, trennen die DNA-Doppelstränge auf und verwenden den jeweils 3'-5' Strang als Matritze zur Synthese eines komplementären 5'-3' Stranges. In der IVT verwendete Uracil-Nukleotid-Triphosphate sind zu einem Drittel an Digoxigenin-gekoppelt (Dig RNA Labeling Kit, Roche). Die Detektion der EBER-Sonde erfolgte durch eine AP-Immunfärbung (siehe 2.11.2) mit einer 1:300 Verdünnung eines anti-Digoxigenin-AP-gekoppelten Fab-Fragmentes (Kat.Nr. 11093274910, Roche) in 100 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl in RNase-freiem H₂O bei pH 7,5.

2.11.3.1 Amplifikation der EBER-Gene

PCR-Ansatz der 1. Runde: 4 µl dNTPs (2 mM)
4 µl 10 x PCR-Puffer (Fermentas ohne MgCl₂)
je 2 µl EBER US 1.Rd (2,5 µM)
je 2 µl EBER LS 1.Rd (2,5 µM)
1,6 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)
add 39 µl H₂O

+ 1 µl DNA (ca. 200 ng)

PCR-Programm der 1. Runde: 95°C 5 Min., 20 x (95°C 50 Sek., 63°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

PCR-Ansatz der 2. Runde: 5 µl dNTPs (2 mM)
5 µl 10 x PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Fermentas)
2,5 µl EBER1 SP6-US bzw. EBER2 SP6-US (2,5 µM)
2,5 µl EBER1 T7-LS bzw. EBER2 T7-LS (2,5 µM)
2 µl MgCl₂ (25 mM, Fermentas)
add 48,7 µl H₂O

+ 1 µl der 1. Runde
+ 0,3 µl Taq-DNA-Polymerase (Fermentas)

PCR-Programm der 2. Runde: 95°C 2 Min., 28 x (95°C 50 Sek., 56°C 30 Sek., 72°C 60 Sek.), 72°C 5 Min., 10°C Pause

Die Isolierung der EBER1- und EBER2-DNA-Fragmente erfolgte über Ausschneiden der DNA-Banden aus einem Agarose-Gel und Aufreinigung der DNA mit dem „High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche).

2.11.3.2 In-Vitro-Transkription und ISH

Die EBER-Gene wurden mit dem „Dig RNA Labeling Kit SP6/T7“ (Roche) transkribiert. Die Transkription mit der SP6-RNA-Polymerase dient in diesem Experiment als „Sense“- bzw. Negativ-Kontrolle und sollte bei der ISH nicht mit den EBER-Transkripten bzw. unspezifisch mit Zell-Transkripten hybridisieren. Die T7-RNA-Polymerase führt zur Synthese des „Anti-sense“-RNA-Stranges, der mit den EBER-Transkripten hybridisieren und über die eingebauten Digoxigenin-UTPs bei der AP-Immunfärbung detektiert werden kann.

IVT-Ansatz:

- 2 µl 10 x NTP-Markierungs-Gemisch (Roche)
- 2 µl 10 x Transkriptions-Puffer (Roche)
- 1 µl RNase-Inhibitor (Roche)
- 2 µl RNA-Polymerase SP6 bzw. T7 (Roche)
- 13 µl EBER1- bzw. EBER2-DNA (PCR-Produkt)

Der IVT-Ansatz wurde 2 Std. bei 37°C inkubiert, die DNA anschließend 15 Min. bei 37°C mit 2 µl DNase I verdaut und die Reaktion mit 2 µl EDTA (0,2 M) gestoppt. Die Effizienz der IVT und die ungefähre Menge der entstandenen RNA wurden auf einem RNA-Agarose-Gel analysiert. Die T7-generierten EBER1- und EBER2-Sonden wurden vor der ISH gemischt. Die Digoxigenin-markierten T7- und zur Kontrolle SP6-Sonden (5 µl Sondenansatz pro 10⁶ Zellen: ca. 2-5 ng Sonde und 2,5 µl Formamid in RNase-freiem H₂O), sowie der Hybridisierungspuffer (siehe 2.11.1) wurden vor der Zugabe zu den Zellen für die ISH 5 Min. bei 80°C separat voneinander erhitzt. Die ISH erfolgte mit jeweils 5 µl Sondenansatz + 20 µl Hybridisierungspuffer pro 1 x 10⁶ Zellen wie in 2.11.1 beschrieben.

2.11.4 Einzelzell-Mikrodissektion

2.11.4.1 Hydraulische Mikrodissektion

Die gefärbten B-Zellen wurden in TBS-Puffer mit Hilfe einer Mikropipette am hydraulischen Mikromanipulator (Narishige, Japan) von den Objektträgern gelöst. Mit einer zweiten Mikropipette, die vorher stumpf angeschliffen wurde und somit eine kleine Öffnung hatte, wurden die Einzelzellen angesaugt und in jeweils ein PCR-Reaktionsgefäß überführt

(Küppers et al., 1993). In den Reaktionsgefäßen für die isolierten Zellen bzw. die Kontrollen waren jeweils 20 µl PCR-Puffer (Expand High Fidelity-Puffer ohne MgCl₂, Roche) vorgelegt. Die Lagerung der Zellen bis zur Analyse erfolgte bei -20°C. Eingesaugter TBS-Puffer diente als Kontrolle dafür, dass sich keine Zellen unspezifisch vom Objektträger gelöst haben und im Puffer schwammen.

2.11.4.2 Laser Mikrodisektion

Die auf Membran-Objektträgern ausgestrichenen B-Zellen wurden am Laser-Mikromanipulator (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried) analysiert. EBV⁺ (FastRed⁺) B-Zellen wurden markiert, mit dem Laser ausgeschnitten und jeweils einzeln in PCR-Puffer (ohne MgCl₂, High Fidelity, Roche) eines über der Zelle ausgerichteten Reaktionsgefäß-Deckels katapultiert, mit dem Puffer abzentrifugiert und bei -20°C gelagert. Es wurden nur EBV⁺ B-Zellen isoliert, die nicht über bzw. unter anderen nicht-gefärbten Zellen lagen, so dass die katapultierte DNA ausschliesslich von EBV⁺ Zellen stammte. Katapultierte Membranstücke ohne Zellen dienten als Kontrolle dafür, dass keine DNA unspezifisch über die Objektträger geschmiert war. Um ein Kleben der Zellen an die Innenwand der Reaktionsgefäße durch unspezifische Proteinbindungen zu vermeiden, wurden die Reaktionsgefäße vor der Isolierung der Zellen 30 Min. mit einer 1%-igen BSA/TBS-Lösung innen mit BSA bemantelt und 30 Min. bei RT getrocknet. Durch eine Oberflächenspannung bestand zudem die Gefahr einer Abstossung der katapultierten Zellen am in die Reaktionsgefäß-Deckel vorgelegten PCR-Puffer. Um dies zu vermeiden, wurde dem PCR-Puffer 1 µl Triton-X100 (Sigma Aldrich) auf 1 ml PCR-Puffer zugefügt. Die hydraulisch- bzw. Laser-mikrodisektierten Einzelzellen wurden mindestens 24 Std. bei -20°C gelagert, um ein Platzen der Zellmembranen sicher zu stellen. Dieses Platzen erleichtert den sich anschließenden Proteinase K-Verdau und ist für die Effizienz der V-Gen- und EBNA1-Einzelzell-PCR (s. 2.5.2) essentiell.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden zunächst monoklonale LCLs aus GC- und naiven B-Zellen etabliert. Besondere Beachtung findet hierbei die Etablierung von monoklonalen LCLs aus GC-B-Zellen, die während der SHM im GC BCR-destruktive Mutationen erfahren haben und somit keinen BCR mehr ausprägen können. Im Anschluss wird in einer Reihe neu-etablierter, monoklonaler LCLs der Einfluss der EBV-Infektion auf B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien und verschiedener BCR-Zustände untersucht. Der Schwerpunkt dieser Untersuchung liegt auf der Ausprägung von GC- und generellen B-Zell-Markern sowie auf der Ausprägung von Genprodukten, die für das HL typisch sind. Eine Mutationsanalyse der V-Genumordnungen in den LCLs soll klären, welchen Einfluss EBV auf das komplizierte System der SHM hat. Abschließend wird die Etablierung einer Methode vorgestellt, die es erstmals ermöglicht, die seltenen EBV⁺ B-Zellen aus dem PB gesunder Menschen zu isolieren. Die Untersuchung dieser in vivo EBV-infizierten Zellen ermöglicht detaillierte Einblicke in die Persistenz-Entwicklung des Virus und gibt evtl. Aufschluss darüber, warum eine EBV-Infektion in seltenen Fällen zur malignen Transformation der Zelle führen kann.

3.1 Etablierung BCR-defizienter GC-LCLs

HRS-Zellen stammen vermutlich von prä-apoptotischen GC-B-Zellen ab, die im Laufe der SHM entweder BCR-destruktive oder BCR-affinitätsmindernde Mutationen erfahren haben. Unter normalen Umständen werden solche B-Zellen im GC nicht positiv-selektioniert und sterben durch Apoptose. Im klassischen HL weisen ca. 25% der Fälle BCR-destruktive Mutationen auf, und auch in einigen PTLD-Fällen konnten solche Mutationen gefunden werden (Bräuninger et al., 2003; Capello et al., 2003; Kanzler et al., 1996; Timms et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit wird untersucht, ob eine EBV-Infektion von GC-B-Zellen in vitro prä-apoptotische B-Zellen vor der Apoptose retten und somit in vivo für die Rettung der prä-apoptotischen HL- und PTLD-Vorläuferzellen verantwortlich sein kann. Eine In-Vitro-Infektion von B-Zellen mit EBV führt in der Regel zur Ausprägung einer Latenz III in den auswachsenden LCLs. Die Latenz III beinhaltet u.a. die Expression des BCR-nachahmenden LMP2A, durch dessen Signal BCR-defiziente B-Zellen gerettet werden könnten.

GC-B-Zellen sind in vivo bereits stark Apoptose-gefährdet und sollten nach der Aufreinigung aus den Tonsillen möglichst schnell mit EBV infiziert werden, um die Apoptose der Zellen abzuwenden und möglichst viele der Zellen zu transformieren. Generell besteht jedoch die Möglichkeit aktivierte, proliferierende B-Zellen in vitro zu transformieren

(Gregory et al., 1988; Mangeney et al., 1995). EBV-infizierte GC-B-Zellen werden durch eine limitierende Verdünnung (engl. limiting dilution, LD) weitestgehend vereinzelt, um monoklonale LCLs zu erhalten. Auswachsende Zellklone werden im Anschluss anhand der V-Genumlagerungen auf ihre Klonalität untersucht. BCR-defiziente LCLs werden dann mit Hilfe einer FACS-Analyse auf die fehlende Expression eines BCR identifiziert. Durch eine detaillierte Analyse der V_H- und V_L-Genumlagerungen können schliesslich BCR-destruktive Mutationen gefunden werden, die die EBV-Infektion als ein wichtiges Transformationsereignis in der frühen HL- und PTLD-Pathogenese unterstreichen.

3.1.1 EBV-Infektion von GC-B-Zellen und Einzelzellklonierung

Humane Tonsillen zur Aufreinigung der GC-B-Zellen wurden zunächst mit einem Skalpell geschreddert und Gewebsreste wurden über ein Sieb abgetrennt. Die TMC wurden über einen Ficoll-Gradienten aufgereinigt. Aus diesen wurden CD77⁺ GC-B-Zellen mittels magnetisch-aktiverter Zellsortierung (MACS) isoliert. Die Isolierung wurde durch die Anfärbung der Zellen mit AK für den GC-B-Zellmarker CD77 und den generellen B-Zellmarker CD20 im FACS-Canto kontrolliert. Die Reinheit der isolierten GC-B-Zellen lag stets über 96%. Die EBV-Infektion der Zellen erfolgte mit 5 ml Überstand der B95-8 Marmoset Zelllinie pro 1×10^7 GC-B-Zellen. Für eine effiziente Infektion wurden die Zellen mit dieser Zelldichte über Nacht im Brutschrank inkubiert. Nach 24 Std. wurde die Kultur durch eine LD in 96er-Mikrotiterplatte kloniert. Die Monoklonalität der Linien ist zur späteren Analyse und Interpretation der RNA- und Protein-Expressionsmuster essentiell. Auswachsende Zellklone wurden GC-LCLs genannt.

3.1.2 Analyse der Klonalität der Zelllinien

Nach der Klonierung ausgewachsene Klone wurden mit einer Familien-spezifischen V_H-Gen-PCR auf ihre Klonalität untersucht. Hierbei wurden nur Zellklone analysiert, die nach der Poisson-Verteilung eine hohe Wahrscheinlichkeit hatten, monoklonal zu sein. Bei der Poisson-Verteilung errechnet sich der Anteil der Fächer, in denen monoklonale Zellen wachsen, durch die Gleichung:

$P(1)/1-P(0)$ = Wahrscheinlichkeit der Monoklonalität der auswachsenden Zellen (M)/Gesamtzahl der Fächer, in denen Zellen wachsen (engl. responding, R).

Die Wahrscheinlichkeit der Monoklonalität der Linien nähert sich 100%, wenn der M/R-Wert = 1 beträgt. In dieser Arbeit wurden Zellklone zur weiteren V_H-Gen-Analyse

verwendet, wenn in <30% der Fächer einer 96er-Mikrotiterplatte Zellen gewachsen sind. Diese waren dann mit 83,5% iger Wahrscheinlichkeit monoklonal (Coller und Coller, 1986).

Die genomische DNA der nach Poisson vermutlich monoklonalen GC-LCLs wurde zur genauen Bestimmung der Klonalität mit einer V_H -Gen-Familien-spezifischen PCR analysiert. Hierbei werden sechs verschiedene PCRs pro Zelllinie durchgeführt. In jeder PCR wird einer der sechs V_H -Familien-spezifischen Vorwärts-Primer mit einer Mischung aus J_H -Familien-spezifischen Rückwärts-Primern kombiniert (Abb. 6). Ein PCR-Produkt entsteht, wenn eine $V_H D_H J_H$ -Genumlagerung der jeweiligen V_H -Genfamilie in der Zelle stattgefunden hat. Eine Zelle mit zwei Allelen für mögliche V_H -Genumordnungen kann demnach nur zu höchstens zwei positiven V_H -Familien-spezifischen PCRs führen (Abb. 6 und 7).

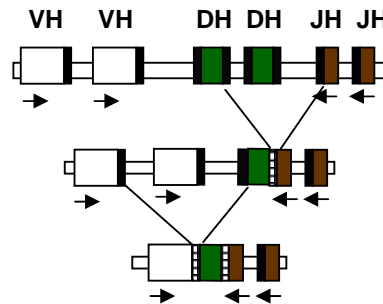


Abb. 6: Schema der V_H -Familien-spezifischen PCR. Die Pfeile (→) zeigen die Primer-Bindestellen und -Orientierungen. Die schraffierten Bereiche deuten die N-Nukleotide an. Bei dieser PCR entsteht nur ein Produkt, wenn eine V_H -Genumlagerung stattgefunden hat.

GC-LCLs, die bei dieser Analyse für mehr als zwei V_H -Genfamilien positiv waren, wurden als nicht-monoklonal eingestuft und nicht weiter analysiert (Tabelle A2 und Abb. 7). Bei GC-LCLs mit einer bzw. zwei positiven V_H -Familien-Genumordnungen wurden zur genauen Bestimmung der Klonalität sowie zur Analyse des Mutationszustandes die V_H -Genumlagerungen sequenziert. Bei den ersten drei Spendern wurden zusätzlich in fast allen potentiell monoklonalen GC-LCLs mögliche weitere Allele mit einer Familien-spezifischen $D_H J_H$ -Gen-PCR gesucht. Bei dem vierten Spender wurden die GC-LCLs nur auf potentielle $D_H J_H$ -Genumlagerungen analysiert, wenn die entsprechende Linie bereits zwei $V_H D_H J_H$ -Genumlagerungen besass (Tabelle A3).

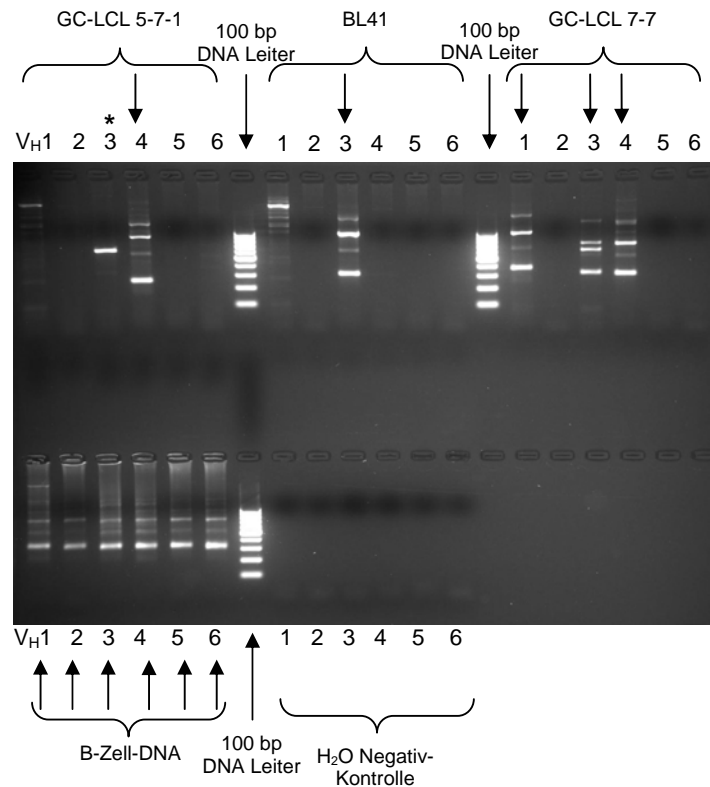


Abb. 7: Beispiel einer V_H -Familien-spezifischen PCR-Analyse. Die Pfeile zeigen die spezifischen PCR-Banden zwischen 300 und 350 bp an bzw. deuten auf die 100 bp DNA-Leiter. Die GC-LCL 5-7-1 hat eine BCR-verkrüppelte V_H4 -Genverbindung, die um 59 bp verkürzt ist und daher unterhalb der 300 bp Bande der DNA-Leiter läuft. Die BL41 trägt eine V_H3 -Genverbindung. Die GC-LCL 7-7 ist für drei V_H -Familien positiv und daher nicht monoklonal. Die B-Zell-DNA ist polyklonal und daher für alle V_H -Genfamilien positiv. Sie dient hier als Positiv-Kontrolle der PCRs. * Es handelt sich bei der 700-800 bp langen Bande der V_H3 -PCR von GC-LCL 5-7-1 um ein V_H3 -Pseudogen-Artefakt. Da in den V_H -PCRs ein Rückwärts- J_H -Primer-Gemisch verwendet wurde, werden die zusätzlichen Banden der V_H -positiven PCRs vermutlich durch stromabwärts-liegende J_H -Gene verursacht.

Die V_H -Gen-Analysen und -Sequenzierungen der GC-LCLs ergaben 103 monoklonale, 48 biklonale und 18 oligoklonale GC-LCLs aus vier Tonsillen (Tabelle 3, A2 und A3). Siebzehn der 24 monoklonalen und drei von sieben biklonalen GC-LCLs von Spender B entstanden durch eine Einzelzell-Klonierung mit 0,5, 1 und 2 Zellen pro Ansatz von einer bereits 15 Tage kultivierten, polyklonalen GC-LCL. Tabelle A3 im Anhang zeigt die $V_H D_H J_H$ -Genumordnungen inkl. der -Mutationszustände und -Funktionalitäten der 103 monoklonalen GC-LCLs. Insgesamt hatten neun der monoklonalen GC-LCLs - davon sieben vom Spender D - unmutierte V_H -Gen-Umordnungen. Diese Linien könnten von GC-Gründerzellen, die die SHM noch nicht aktiviert haben, abstammen (Lebecque et al., 1997).

Unter den 94 GC-LCLs mit mutierten V_H -Gen-Umordnungen lag die Mutationsfrequenz bei einem Mittelwert von 4,1% und variierte von 0,4% bis 15,5% (Tabelle A3).

Tabelle 3: Übersicht der etablierten GC-LCLs von 4 Spendern.

Spender der GC-B-Zellen	Anzahl der monoklonalen GC-LCLs	Anzahl der biklonalen GC-LCLs	Anzahl der oligoklonalen GC-LCLs
A	15	5	4
B	24	7	0
C	23	5	3
D	41	31	11

3.1.3 Screen auf Oberflächenrezeptornegativität

Die Suche nach GC-LCLs, die im Verlauf der SHM im GC BCR-destruktive Mutationen erfahren haben und daher keine BCR mehr auf der Oberfläche ausprägen können, wurde zunächst mit einer FACS-Analyse auf die Expression von Ig κ und Ig λ durchgeführt. Erschwerend war bei dieser Analyse, dass eine Expression von EBNA2 innerhalb der Latenz III in den GC-LCLs zu einer Herabregulation der IgH-Expression führt (Jochner et al., 1996). Zur Detektion der IgL mittels Durchflusszytometrie wurde aus diesem Grund die sehr sensitive Methode der Kopplung von Ig κ - und Ig λ -AK an fluoreszierende Liposomen angewandt (Abb. 8). Fluoreszierende Liposomen erhöhen die Sensitivität der FACS-Analyse um das 100-1000 fache (Scheffold et al., 1995).

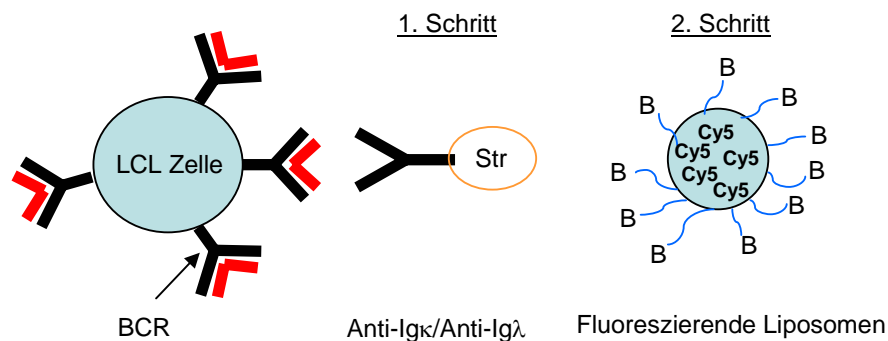


Abb. 8: Schematische Darstellung der Immunfärbung mit fluoreszierenden Liposomen. Im 1. Schritt werden die IgL mit einem Streptavidin-gekoppelten AK markiert. Im 2. Schritt binden die Biotin-Moleküle der Doppel-Lipidschicht der Cy5-Fluoreszenzfarbstoff-enthaltenen Liposomen an das Streptavidin. Str steht für Streptavidin. B steht für Biotin.

Bei dieser Untersuchung wurden alle der 103 monoklonalen GC-LCLs von vier Spendern analysiert. 38 GC-LCLs zeigten hierbei eine Oberflächen-Expression von Ig κ und 19 GC-LCLs exprimierten Ig λ (Tabelle 4). Überraschenderweise war fast die Hälfte der monoklonalen GC-LCLs weder Ig κ^+ noch Ig λ^+ (exemplarisch in Abb. 9 und Tabelle A4). Die normalerweise lebenslange Abhängigkeit der B-Zellen von der Expression eines BCR scheint in diesen 46 GC-LCLs aufgehoben zu sein.

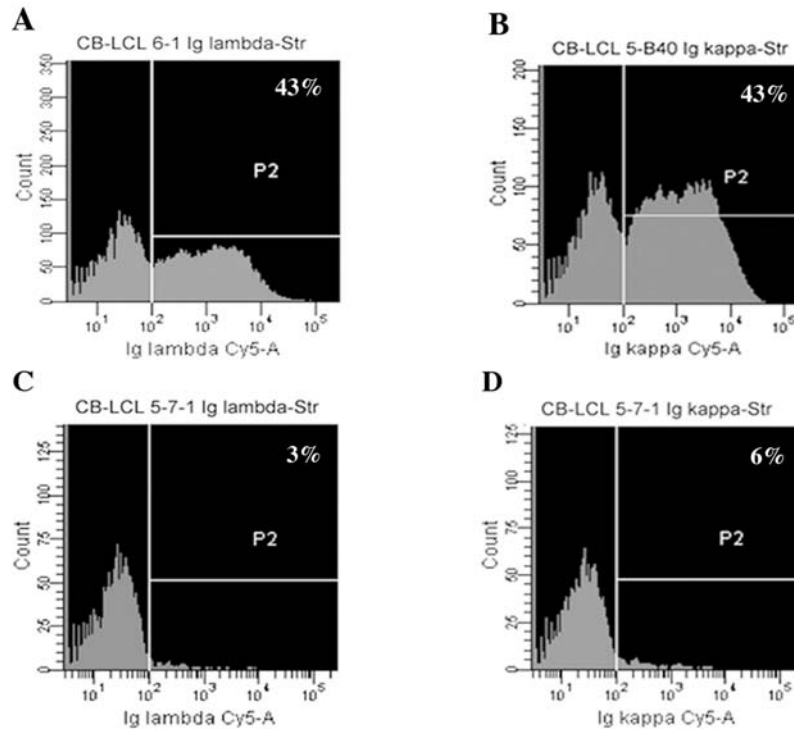


Abb. 9: Exemplarische Histogramme der FACS-Färbungen mit fluoreszierenden Liposomen. A und C) Ig λ -Färbung, B und D) Ig κ -Färbung, A) GC-LCL 6-1 ist Ig λ^+ , B) GC-LCL 5-B40 ist Ig κ^+ , C und D) GC-LCL 5-7-1 ist Ig κ^- und Ig λ^- .

Tabelle 4: Ig-Oberflächen-Expression von 103 GC-LCLs vier verschiedener Spender.

Spender der GC-B-Zellen	Anzahl der monoklonalen GC-LCLs	Anzahl der Ig κ^+ GC-LCLs	Anzahl der Ig λ^+ GC-LCLs	Anzahl der Ig $^-$ GC-LCLs
A	15	7	0	8
B	24	13	1	10
C	23	8	4	11
D	41	10	14	17

Die Analyse einer $\text{Ig}\lambda^+$ und fünf sIg^- GC-LCLs zeigte, dass LMP2A als BCR-Ersatz in GC-LCLs exprimiert wird (Abb. 10 und Tabelle 5). Eine exemplarische Analyse von sieben GC-LCLs hat gezeigt, dass LMP1 und EBNA2, charakteristisch für eine EBV-Latenz III, ebenfalls in GC-LCLs exprimiert werden (Tabelle 5).

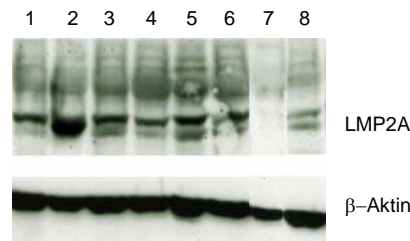


Abb. 10: Western-Blot-Analyse der LMP2A-Expression in GC-LCLs. Exemplarisch wurden folgende GC-LCLs analysiert 1: $\text{Ig}\lambda^+$ GC-LCL 6-1; 2: sIg^- GC-LCL 5-13-4; 3: sIg^- GC-LCL 6-47; 4: sIg^- GC-LCL 5-7-1; 5: sIg^- GC-LCL 4-8; 6: sIg^- GC-LCL 4-17; 7: die EBV-negative Zelllinie BL41 dient als Negativ-Kontrolle; 8: die PB-LCL 970402 dient als Positiv-Kontrolle.

Tabelle 5: Phänotypische Bestimmung des EBV-Latenzprofils in GC-LCLs.

LMP1	LMP2A	EBNA2
7/7	6/6	7/7

3.1.4 Mutationsanalyse und Suche nach BCR-destruktiven Mutationen

Die 46 GC-LCLs, die in der Ig-Oberflächenfärbung negativ waren, wurden im Folgenden auf Mutationen in den $V_H D_H J_H$ - sowie V_L -Genumlagerungen untersucht, die für die fehlende Oberflächen-Expression der BCR ursächlich sein könnten. Zu diesen Mutationen gehören a) Punktmutationen, die zu einem verfrühten Stop-Kodon führen, b) Deletionen und Duplikationen, die zu einer Leserasterverschiebung führen, sowie c) Mutationen, die zum Austausch der drei konservierten Aminosäuren führen, die zur Stabilisierung des AK über Schwefelbrücken notwendig sind, und d) Mutationen, die die Spleissstellen der Leitpeptidregion der V_H -Genumlagerungen betreffen. Nach diesen möglichen Mutationen wurde in den insgesamt 46 GC-LCLs mit spezifischen V_H -, $V_H L$ - und V_L -PCRs und entsprechenden Sequenzanalysen intensiv gesucht. Eine Übersicht der V_H - und V_L -Genumlagerungen der sIg^- GC-LCLs geben die Tabellen A3 bzw. A4. Die Mutationsfrequenzen der V_L -Genverbindungen liegen in den meisten LCLs leicht unter denen der V_H -Genverbindungen.

Bei der Mutationssuche konnten vier GC-LCLs mit putativen BCR-destruktiven Mutationen gefunden werden. Diese Mutationen betrafen in allen vier Linien V_H -Genumlagerungen, die eine intakte CDR III im korrekten Leseraster aufwiesen, und somit ursprünglich einen funktionellen BCR exprimiert haben müssen. Die GC-LCL 7-36 hat während der SHM eine Punktmutation erfahren, die zu einem Austausch des konservierten Cysteins in der FR III durch ein Threonin geführt hat (Abb. 11C). Diese Austausch-Mutation verhindert vermutlich die Bildung einer Bisulfidbrücke, die für die korrekte Faltung der Ig-Ketten notwendig ist. Die Ausprägung eines funktionellen BCR kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden. Bei den drei anderen GC-LCLs handelt es sich eindeutig um BCR-destruktive Mutationen (Abb. 11 und 12). Die GC-LCL 4-17 hat im Verlauf der SHM im GC zwei Mutationen im Anfang der FR III des V_H -Gens erhalten. Durch diese Mutationen ist aus einem „TAC“ Tyrosin-Kodon ein „TGA“ Stop-Kodon geworden (Abb. 11A und 12A). Die Ausprägung eines funktionellen BCR ist damit ausgeschlossen.

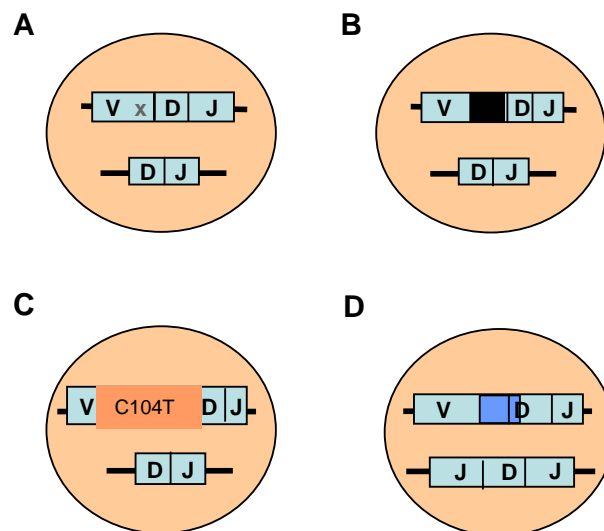
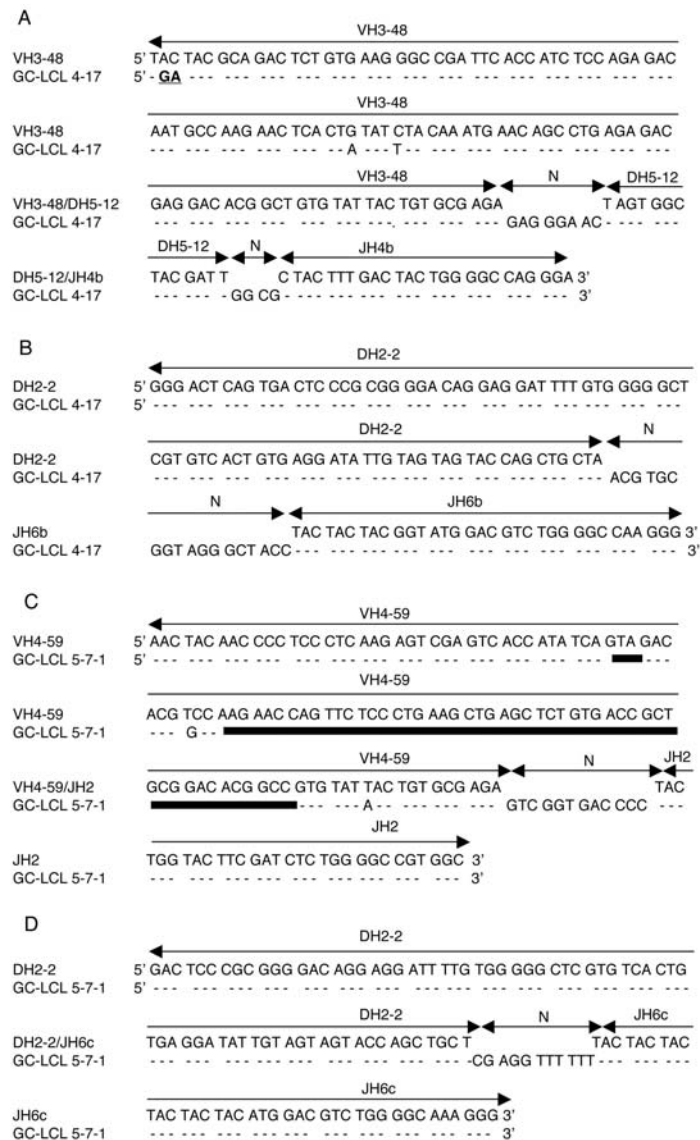


Abb. 11: Schematische Darstellung der Ig-Schwerketten-Loci der vorraussichtlich BCR-verkrüppelten GC-LCLs. A) GC-LCL 4-17, B) GC-LCL 5-7-1, C) GC-LCL 7-36, D) GC-LCL 7-85; A) x steht für ein Stop-Kodon; B) der schwarze Balken deutet die Deletionen in FR III an; C) ein konserviertes Cystein ist durch ein Threonin ausgetauscht; D) der blaue Balken zeigt den duplizierten Teil der FR III und CDR III.

Bei der GC-LCL 5-7-1 ist es während der Affinitätsreifung zu einer Deletion von einmal 3 und einmal 51 Nukleotiden in der FR III gekommen (Abb. 11B und 12C). Obwohl diese Deletionen nicht zu einer Verschiebung des Leserasters geführt haben, ist der Verlust von insgesamt 18 Aminosäuren in der FR III mit der Faltung des AK und somit der Expression des BCR nicht kompatibel. In der GC-LCL 7-85 hat die SHM zu einer Duplikation von 59 Nukleotiden in der FR III geführt (Abb. 11D und 12E). Diese Duplikation hat eine

Leserasterverschiebung zur Folge, die zu einem verfrühten Stop-Kodon führt. Es ist bekannt, dass die SHM in einigen Fällen auch zu Deletionen und Duplikationen in den V_H-Genumlagerungen führen kann (Goossens et al., 1998). Die somatische Punktmutation im duplizierten und originalen rearrangierten D_H3-23-Gen ist ein Hinweis darauf, dass die Duplikation nach dieser Mutation stattgefunden haben muss und im Zuge der SHM im GC passiert ist (Abb. 12E).



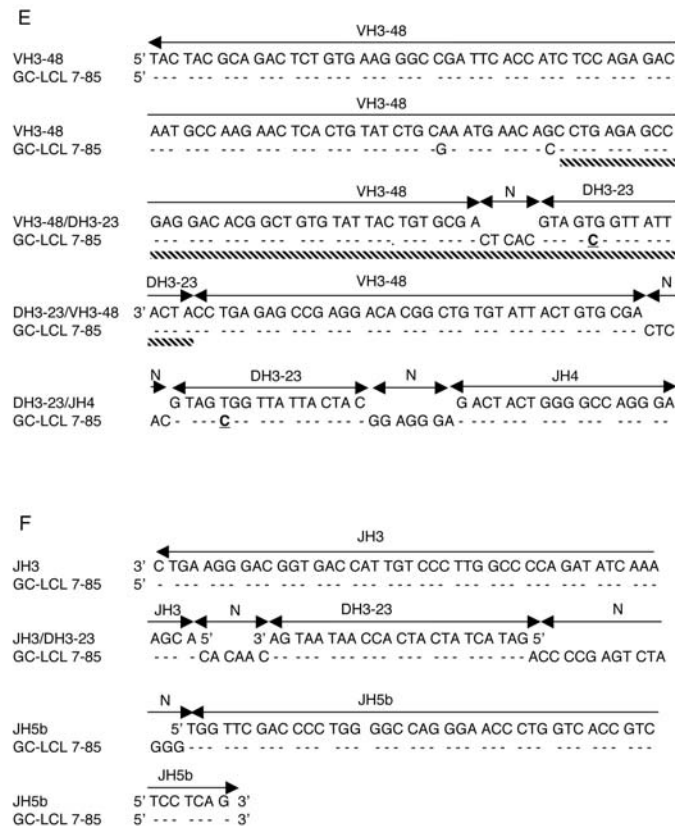


Abb. 12: $V_H D_H J_H$ - und $D_H J_H$ -Genumordnungen der drei BCR-verkrüppelten GC-LCLs. A, C, E zeigen die $V_H D_H J_H$ -Genumordnungen der GC-LCL 4-17, GC-LCL 5-7-1 und GC-LCL 7-85 vom 5' Ende der FR III bis zum Start der J_H -Primer-Sequenz. B, D, F zeigen die $D_H J_H$ -Genumordnungen der GC-LCL 4-17, GC-LCL 5-7-1 und GC-LCL 7-85 stromaufwärts der RSS-Regionen 5' der D_H -Segmente bis zum Start der J_H Primer-Sequenz. A, B: GC-LCL 4-17; C, D: GC-LCL 5-7-1; E, F: GC-LCL 7-85. N steht für N-Nukleotide. A: Die beiden Punktmutationen im ersten Kodon der FR III führen zu einem Stop-Kodon und sind fett gedruckt und unterstrichen. C: Die GC-LCL 5-7-1 hat 3-bp und 51-bp lange Deletionen, die hier als schwarze Balken zu sehen sind. Ein D_H -Gen konnte in dieser Sequenz nicht identifiziert werden, könnte jedoch Teil der hier dargestellten N-Nukleotide sein. E: Die GC-LCL 7-85 hat eine 59-bp lange Duplikation in der FR III/CDR III, die hier als schraffierter Balken dargestellt ist. Die gemeinsame Punktmutation in der duplizierten und originalen D_H3-23 Gensequenz ist fett gedruckt und unterstrichen. F: Es handelt sich hier um ein invertiertes D_H3-23 -Gen (s. 3.1.4 und Abb. 13).

In seltenen B-Zellen hat im Zuge der B-Zellentwicklung im Knochenmark auf beiden Allelen eine $V_H D_H J_H$ -Genumlagerung stattgefunden. Um auszuschließen, dass die BCR-destruktiven Mutationen in den vier o.g. GC-LCLs auf den zweiten evtl. ursprünglich nicht-funktionellen Allelen eingeführt wurden, war es zusätzlich wichtig, die zweiten Allele dieser vier GC-LCLs zu identifizieren. In allen vier Linien wurde, ausser den putativen BCR-

verkrüppelten V_H -Genverbindungen, nur je eine D_HJ_H -Genverbindung gefunden, so dass die vermutlich BCR-destruktiven Mutationen tatsächlich in den ursprünglich verwendeten, funktionellen $V_HD_HJ_H$ -Genumlagerungen stattgefunden haben (Abb. 11 und 12B, D, F und Tabelle A3). Die D_HJ_H -Genumordnung der GC-LCL 7-85 konnte nur durch eine LDI-PCR identifiziert werden. Bei dieser Genumordnung wurde die RSS-Region vor dem D_H3 -23-Gen geschnitten und mit der RSS-Region von J_H5b so rekombiniert, dass das J_H -Fragment dazwischen invertiert wurde (Abb. 12F und 13). Es muss sich um eine zweite D_HJ_H -Genumordnung auf diesem Allel gehandelt haben, da zwischen dem D_H3 -23-Gen und dem J_H3 -Gen die J_H1 - und J_H2 -Gene nicht mehr vorhanden und N-Nukleotide eingeführt worden sind (Abb. 13).

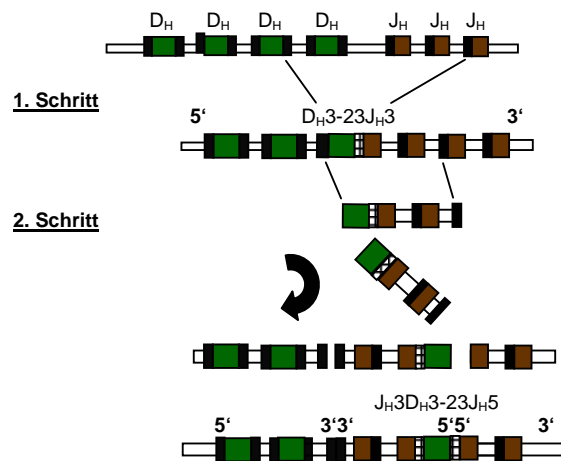


Abb. 13: Schematische Darstellung der D_HJ_H -Genumordnung von GC-LCL 7-85.

Die B-Zellen, die zu den drei eindeutig BCR-verkrüppelten GC-LCLs ausgewachsen sind, wären in vivo durch das Fehlen eines BCR in die Apoptose gegangen. Das Auswachsen dieser B-Zellen zu stabilen Zelllinien beweist damit zum ersten Mal, dass die EBV-Infektion humane BCR-verkrüppelte GC-B-Zellen in vitro vor der Apoptose retten kann, und weist darauf hin, dass die EBV-Infektion im GC in der frühen Pathogenese EBV-positiver Fälle des HL und PTLID eine wichtige Rolle spielt.

3.1.5 Quantitative Analyse der Ig-Transkription

In 42 GC-LCLs konnten weder in den V_H - noch in den V_L -Genumlagerungen BCR-destruktive Mutationen gefunden werden. Die BCR-Negativität dieser Linien ist daher entweder durch eine Inhibition auf transkriptioneller Ebene oder durch post-transkriptionelle Effekte, wie Schwierigkeiten bei der Protein-Faltung durch Aminosäure-Austausch-Mutationen oder wie Protein-Modifikationen, verursacht. Tatsächlich führt EBNA2 zu einer

Herabregulation der IgH-Transkription (Jochner et al., 1996). Ob dieser Effekt in den GC-LCLs zu einer vollständigen Rezeptor-Defizienz führen kann, wurde mittels quantitativer RT-PCR untersucht. Hierfür wurden exemplarisch acht BCR-negative, drei BCR-positive monoklonale GC-LCLs sowie zwei monoklonale BCR-negative und zwei biklonale PB-LCLs auf die mRNA-Ausprägung von IgM, IgA, IgG, Ig κ und Ig λ untersucht (Tabelle 6). Die Stärken der Ig-Transkription wurden ins Verhältnis gesetzt zu den entsprechenden Ig-Ausprägungsstärken von CD19⁺ PB-B-Zellen.

Tabelle 6: Quantitative RT-PCR der Ig-Transkripte.

LCLs		IgM (%)	IgA (%)	IgG (%)	Ig κ (%)	Ig λ (%)	Funktionelle V _L -Gen- umordnungen
<u>sIg⁻ GC-LCLs</u>	6-14	16	<0,01	<0,01	<0,01	8	V λ 2-11/J λ 1
	5-17-3	<0,01	<0,01	9	1	0,04	V κ 3-20/J κ 3
	5-B3	<0,01	<0,01	32	<0,01	14	V λ 1-47/J λ 7
	5-5-1	0,8	<0,01	32	<0,01	0,1	V κ 3-15/J κ 5
	5-B4	<0,01	<0,01	9	6	3	V λ 2-11/J λ 1
	5-13-4	0,1	<0,01	10	1	20	V λ 2-14/J λ 2/3
	4-21	1	<0,01	63	0,8	128	V λ 3-1/J λ 2/3
	4-8	9	<0,01	18	2	40	V λ 3-21/J λ 1
<u>sIg⁺ GC-LCLs</u>	6-1	0,3	3	<0,01	<0,01	6	V λ 3-19/J λ 2/3
	6-44	0,4	<0,01	15	0,2	11	V λ 1-51/J λ 2/3
	5-B40	30	0,02	<0,01	14	0,1	V κ 1-9/J κ 4
<u>PB-LCLs</u>	IMEBV ^a	5	0,1	5	0,7	0,03	na
	031006 ^a	0,5	<0,01	0,3	<0,01	3	na
	030515 ^b	8	0,02	<0,01	0,09	2	na
	940410 ^b	<0,01	0,2	<0,01	<0,01	0,7	na

Die Ig-Transkriptionsstärken der LCLs wurden auf die jeweiligen Ig-Transkriptionsstärken von CD19⁺ PB-B-Zellen, die auf 100% festgelegt wurden, normalisiert. ^a Diese PB-LCLs sind biklonal. ^b Diese PB-LCLs sind sIg-negativ. na steht für nicht analysiert.

Die Transkription der IgH-Loci war in allen GC-LCLs um das 1,6- bis 100-fache der IgH-Expression von CD19⁺ PB-B-Zellen verringert. Die GC-LCLs 5-5-1, 5-13-4, 4-21, 4-8, 6-1, 6-44 und 5-B40 sowie die PB-LCLs IMEBV, 031006 und 030515 zeigten eine Ausprägung zwei verschiedener Ig-Isotypen-Transkripte (Tabelle 6). In den GC-LCLs 5-5-1 und 4-8 wird dies vermutlich dadurch verursacht, dass es in diesen Linien auf beiden Allelen zu

$V_H D_H J_H$ -Genumlagerungen gekommen ist (Tabelle 6). In den übrigen acht Linien könnte die mRNA-Ausprägung zwei verschiedener Isotypen durch einen Klassenwechsel innerhalb der monoklonalen LCL oder durch die Transkription von Keimbahn- C_H -Genen bzw. $D_H J_H$ -Genverbindungen verursacht worden sein. Erstaunlicherweise ähneln sich jedoch die Ausprägungs-Stärken der IgH-Transkripte zwischen den BCR^+ und BCR^- GC-LCLs, so dass die BCR-Negativität der acht mittels FACS als BCR^- eingestuft GC-LCLs nicht einzig durch eine Herabregulation der IgH-Transkription zu erklären ist (Tabelle 6).

Die IgL-Transkriptionsstärken der GC-LCLs waren in den meisten Fällen um das 5- bis 100-fache der IgL-Expression von $CD19^+$ PB-B-Zellen verringert. Nur in den zwei GC-LCLs 4-8 und 4-21 wurden IgL-Transkripte gemessen, die denen in $CD19^+$ PB-B-Zellen entsprechen (Tabelle 6). In den meisten GC-LCLs wurden IgL-Transkripte gefunden, die auch bei der Sequenzanalyse eine funktionelle V_L -Genumordnung gezeigt haben. Die zusätzliche Ausprägung der anderen IgL beruht vermutlich wie bei den Ig-Isotypen auf der Ausprägung von nicht-funktionellen IgL-Genumordnungen oder auf der Transkription von Keimbahn-Genen. Die GC-LCLs 5-B4, 5-13-4 und 4-8 tragen z.B. V_κ -Genverbindungen, die nicht im Leseraster sind, jedoch durch SHM-eingeführte Mutationen tragen (Tabelle 6). Da die SHM von der Transkription abhängig ist (Chaudhuri et al., 2003; Fukita et al., 1998; Peters und Storb, 1996), weisen diese Mutationen daraufhin, dass diese V_κ -Genverbindungen nicht durch das KDE inaktiviert wurden, sondern immer noch transkribiert werden. In der GC-LCL 5-5-1 konnte keine V_κ -Transkription festgestellt werden, obwohl die Linie eine funktionelle V_κ -Genverbindung besitzt und keine V_λ -Genumordnung mittels PCR gefunden werden konnte. Die leichte Ausprägung von V_λ in dieser GC-LCL beruht wahrscheinlich auf einer Keimbahn-Transkription.

Die quantitative RT-PCR hat gezeigt, dass die BCR-Negativität nur in der GC-LCL 5-5-1 durch eine Herabregulation der Transkription zu erklären ist. Die übrigen sieben BCR-negativen GC-LCLs zeigen in ihren V_H - und V_L -Transkriptionsstärken keine Unterschiede zu den drei BCR^+ GC-LCLs oder den zwei biklonalen BCR^+ PB-LCLs. Der Defekt in der Ausprägung eines funktionellen BCR liegt demnach auf der post-transkriptionellen Ebene und könnte auf eine Inhibition der Translation durch miRs, auf SHM-verursachte Schwierigkeiten bei der Proteinfaltung der Ig-Ketten bzw. auf post-translationale Ig-Modifikationen, die eine BCR-Ausprägung verhindern, zurückzuführen sein.

3.2 Etablierung von LCLs aus naiven B-Zellen

Um den Einfluss von EBV auf B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien zu analysieren und evtl. GC- oder BCR-spezifische, EBV-abhängige Ausprägungs-Signaturen festzustellen, wurden zunächst monoklonale LCLs aus naiven B-Zellen etabliert.

3.2.1 Aufreinigung und EBV-Infektion der naiven B-Zellen aus dem PB

PBMCs wurden über einen Ficoll-Gradienten isoliert. In den ersten Versuchen zur Etablierung von LCLs aus naiven B-Zellen wurden aus den PBMCs zunächst Monozyten, die meisten T-Zellen, Gedächtnis-B-Zellen und einige natürliche Killerzellen mittels eines CD11b-/CD27-MACS abgereichert. Anschließend wurden naive B-Zellen über eine CD27⁻/IgD⁺-FACS-Sortierung isoliert und mit EBV-infiziert. Eine V_H-Gen-Analyse der auswachsenden Zellklone hat jedoch ergeben, dass die meisten Zelllinien mutierte V_H-Genumordnungen trugen. Trotz der hohen Reinheit der isolierten naiven B-Zellen von >95%, sind demnach in diesen Zellkulturen wenige noch-vorhandene Gedächtnis-B-Zellen präferentiell ausgewachsen.

Eine Analyse verschiedener Sortierungsstrategien hat gezeigt, dass die erste Anreicherung naiver B-Zellen aus PBMCs am besten durch zwei konsekutive CD11b-/CD27-MACS-Schritte zu erreichen ist. Da bei vorherigen FACS-Sortierungen ein enges Sortierfenster zu hohen Zellverlusten geführt hat, wurden die CD11b⁻, CD27⁻ und CD19⁺ naiven B-Zellen nach dem CD11b-/CD27-MACS über eine CD19-MACS-Anreicherung isoliert. Die Zellzahl der auf diese Weise isolierten naiven B-Zellen betrug 4×10^6 . Die Reinheit der isolierten CD27⁻ und IgD⁺ naiven B-Zellen wurde mit einer FACS-Färbung für CD27 und IgD kontrolliert und erreichte 99%. Die Infektion von 4×10^6 naiven B-Zellen erfolgte mit 2 ml Überstand der B95-8 Marmoset-Zelllinie in einer 24er-Mikrotiterplatte. Nach 24 Std. wurden die Zellen durch eine LD in 96er-Mikrotiterplatten kloniert, um monoklonale LCLs aus naiven B-Zellen (N-LCLs) zu erhalten. Wie bei den GC-LCLs ist die Monoklonalität der Linien zur späteren Analyse und Interpretation der Expressionsmuster unerlässlich. Die Etablierung der N-LCLs erwies sich durch die geringe Zellzahl als eher schwierig. Es sind insgesamt 49 Zellklone ausgewachsen.

3.2.2 Validierung der Naivität der isolierten Zellen

Bei anfänglichen Versuchen der Etablierung von N-LCLs sind Klone ausgewachsen, die mutierte V-Genumlagerungen als Hinweis auf eine bereits durchlaufene GC-Reaktion aufwiesen. Dieser Befund deutete stark darauf hin, dass einige wenige Gedächtnis-B-Zellen unter den hoch-aufgereinigten naiven B-Zellen von EBV transformiert und bevorzugt

ausgewachsen sind. Zur Validierung der aufgereinigten naiven B-Zellen wurden daher bei dem o.g. Experiment (s. 3.2.1) zusätzlich zu der FACS-Kontrolle und Bestimmung der 99%-igen Reinheit 2×10^5 isolierte B-Zellen vor der EBV-Infektion abgenommen und die V_H -Genumlagerungen auf somatische Mutationen untersucht.

Bei der Analyse der genomischen DNA dieser polyklonalen B-Zellen wurde exemplarisch die V_H1 -Genfamilie mittels V_H -Gen-PCR amplifiziert, das PCR-Fragment isoliert und in den Bakterienvektor pGEM-T-easy kloniert. Nach der Transformation in kompetente Bakterien konnten auf diese Weise Bakterienklone mit jeweils individuellen V_H1 -PCR-Produkt-Fragmenten isoliert und sequenziert werden. Die Analyse validierte mit 13 unmutierten von 16 analysierten V_H1 -Sequenzen die hohe Aufreinigung naiver B-Zellen. Die vier Mutationen in den drei übrigen Sequenzen könnten entweder bei der Amplifikation der PCR-Fragmente durch die DNA-Polymerase eingeführt worden sein oder seltene V_H -Gen-Polymorphismen darstellen. Es könnte sich jedoch auch um tatsächlich sehr leicht mutierte Zellen handeln.

3.2.3 Analyse der Klonalität der N-LCLs und Mutationsanalyse

Nach der Klonierung auswachsende Linien wurden wie die GC-LCLs mit einer Familienspezifischen V_H -Gen-PCR auf ihre Klonalität untersucht. Es wurden nur Zellklone analysiert, die nach der Poisson-Verteilung eine hohe Wahrscheinlichkeit hatten, monoklonal zu sein. N-LCLs, die zwei $V_H D_H J_H$ -Genumordnungen aufwiesen, wurden zusätzlich mit der $D_H J_H$ -Gen-PCR auf mögliche weitere Allele analysiert. Es sind insgesamt drei monoklonale, neun biklonale und 37 oligoklonale N-LCLs ausgewachsen. Bei der V_H -Gen-Analyse der mono- und biklonalen N-LCLs waren 17 V_H -Gensequenzen unmutiert und validierten somit die Abstammung der Linien von naiven, V_H -unmutierten B-Zellen.

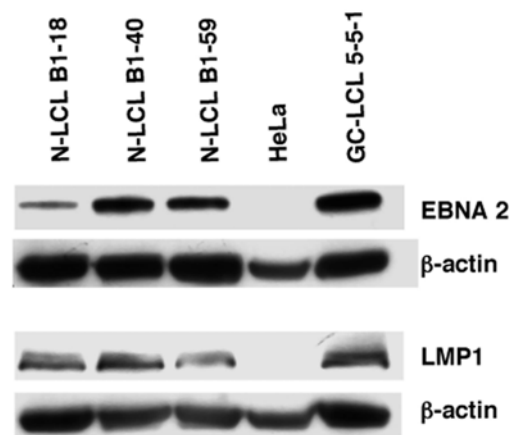


Abb. 14: Western Blot Analyse der Expression der Latenz III-charakteristischen EBV-Proteine LMP1 und EBNA2 in den monoklonalen N-LCLs. Die Expression von β -Aktin dient als Ladekontrolle. Die GC-LCL 5-5-1 ist als Positiv- und die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa als Negativ-Kontrolle gezeigt.

Die drei monoklonalen N-LCLs wurden ferner auf die Expression der Ig-Isotypen analysiert. Alle drei Zelllinien exprimierten wie primäre naive B-Zellen IgM und IgD auf der Zelloberfläche. In diesem Experiment sind somit erstmalig monoklonale LCLs aus konventionellen, naiven B-Zellen etabliert worden. Normalerweise wird in LCLs die Latenz III von EBV ausgeprägt. Die gleichzeitige Expression von LMP1 und EBNA2 als Merkmal der Latenz III konnte auch in den drei monoklonalen N-LCLs gefunden werden (Abb. 14).

3.3 Phänotypische Analyse der monoklonalen GC- und N-LCLs

Zur Analyse des Einflusses von EBV auf B-Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien wurden vier verschiedene Arten von monoklonalen LCLs analysiert. Zu diesen gehörten BCR-positive, BCR-negative und BCR-verkrüppelte GC-LCLs sowie BCR-positive N-LCLs. Jeweils drei monoklonale Linien wurden im Folgenden auf die Ausprägung von ausgewählten B-Zell-spezifischen und HL-typischen Markern untersucht (Tabelle 7). Die Ausprägungsstärken dieser Oberflächen-Antigene in primären naiven und GC-B-Zellen sind zum Vergleich in den Tabellen 8 und A5 sowie in den unteren Reihen der Abb. 15 und als Positiv- bzw. Negativ-Kontrollen der Abb. 16 dargestellt.

Tabelle 7: Merkmale der zur Analyse ausgewählten monoklonalen GC- und N-LCLs.

	Zelllinie	V _H -Gen- umordnungen	Mutations-Frequenz (%)	BCR- Funktionalität
BCR-verkrüppelte GC-LCL	4-17	V _H 3-48	6,0	verkrüppelt
	5-7-1	V _H 4-59	1,4	verkrüppelt
	7-85	V _H 3-48	1,0	verkrüppelt
BCR-negative GC-LCL	5-5-1	V _H 3-64	2,3	aus dem Leseraster
		V _H 4-59	4,2	funktionell
	5-B4	V _H 3-7	2,2	funktionell
		V _H 4-4	2,6	aus dem Leseraster
	6-28	V _H 3-21	6,7	funktionell
BCR-positive GC-LCL	5-2-2	V _H 3-48	4,1	funktionell
	5-B8	V _H 4-34	13,3	funktionell
	6-16	V _H 1-46	2,8	aus dem Leseraster
		V _H 3-30	1,5	funktionell
BCR-positive N-LCL	B1-18	V _H 3-23	0	funktionell
		V _H 3-64 ^a	0	nicht- funktionell
	B1-40	V _H 3-21	0	funktionell
	B1-59	V _H 3-23	0	funktionell

^a nicht-funktionell, verursacht durch ein Stop-Kodon in der CDR III

Zu den ausgewählten Markern gehörten die B-Zell-spezifischen Proteine CD20, CD79b, Pu.1, Syk und EBF, der GC- und Gedächtnis-B-Zellmarker CD27, die GC-B-Zell-assoziierten Marker CD38, CD77, BCL-6 und AID sowie die für das HL-typischen Marker CD30 und GATA3. GATA3 ist ein T-Zell-spezifischer TF und wird im HL aberrant ausgeprägt. Viele der B-Zellmarker sind typischerweise im HL herabreguliert (Schwering et al., 2003). Die Ausprägung der Oberflächen-Antigene CD20, CD27, CD30, CD38, CD77 und CD79b in den LCLs wurde im FACS analysiert. Typische Ausprägungsstärken dieser Marker sind für jeweils zwei LCLs sowie für primäre GC und naive B-Zellen in Abb. 15 dargestellt. Die Ausprägung der Signalkinase SYK, der TF GATA3, BCL-6, EBF und PU.1 und der GC-assoziierten Cytidin-Deaminase AID in den LCLs wurde durch eine Western-Blot-Analyse untersucht (Abb. 16).

Der generelle B-Zellmarker CD20 wurde in fast allen untersuchten 12 LCLs mittelstark ausgeprägt (Tabellen 8 und A5). Die GC-LCL 5-7-1 zeigte eine leicht geringere und die N-LCLs B1-59 eine stärkere CD20-Expression (Abb. 15A, obere Reihe). Der Gedächtnis-B-Zellmarker CD27 wurde in fast allen GC-LCLs herabreguliert. Die GC-LCL 6-28 zeigte eine mittelstarke CD27-Expression. Hingegen wurde bei der GC-LCL 5-B4 die Ausprägung von CD27 komplett eingestellt (Abb. 15B, obere Reihe). Erstaunlicherweise erwiesen sich die N-LCLs ebenfalls als schwach CD27⁺ (Tabellen 8 und A5). CD27 wird innerhalb der reifen B-Zellpopulationen nicht auf naiven B-Zellen ausgeprägt, sondern erst im GC hochreguliert. Es hat somit eine EBV-abhängige und GC-unabhängige Induktion des Gedächtnis-B-Zellmarkers stattgefunden. Eine Expression von CD30 in LCLs wurde bereits beschrieben (Gregory et al., 1988). Alle 12 hier untersuchten LCLs validierten diese Studie. Zudem konnten in 2/3 der LCLs Unterpopulationen festgestellt werden (exemplarisch gezeigt bei einer von zwei LCLs in Abb. 15C). Es bleibt unklar, ob diese Expressionsunterschiede innerhalb der monoklonalen LCLs evtl. auf eine, kürzlich für hämatopoetische Stammzellen beschriebene, asymmetrische Zellteilung zurück zu führen sind (Beckmann et al., 2007).

Die Expression des GC-B-Zellmarkers CD38 in LCLs wurde bereits gezeigt (Ling et al., 1989; Rochford et al., 1993). In vier von neun monoklonalen GC-LCLs hat die EBV-Infektion zu einer leichten Herabregulation von CD38 geführt. Die N-LCLs zeigten wie die übrigen fünf GC-LCLs und ähnlich der primären GC-B-Zellen eine starke CD38-Ausprägung (Abb. 15D und Tabelle 8 und A5). Die EBV-Infektion hat somit in naiven B-Zellen zu einer Verstärkung der CD38-Ausprägung geführt.

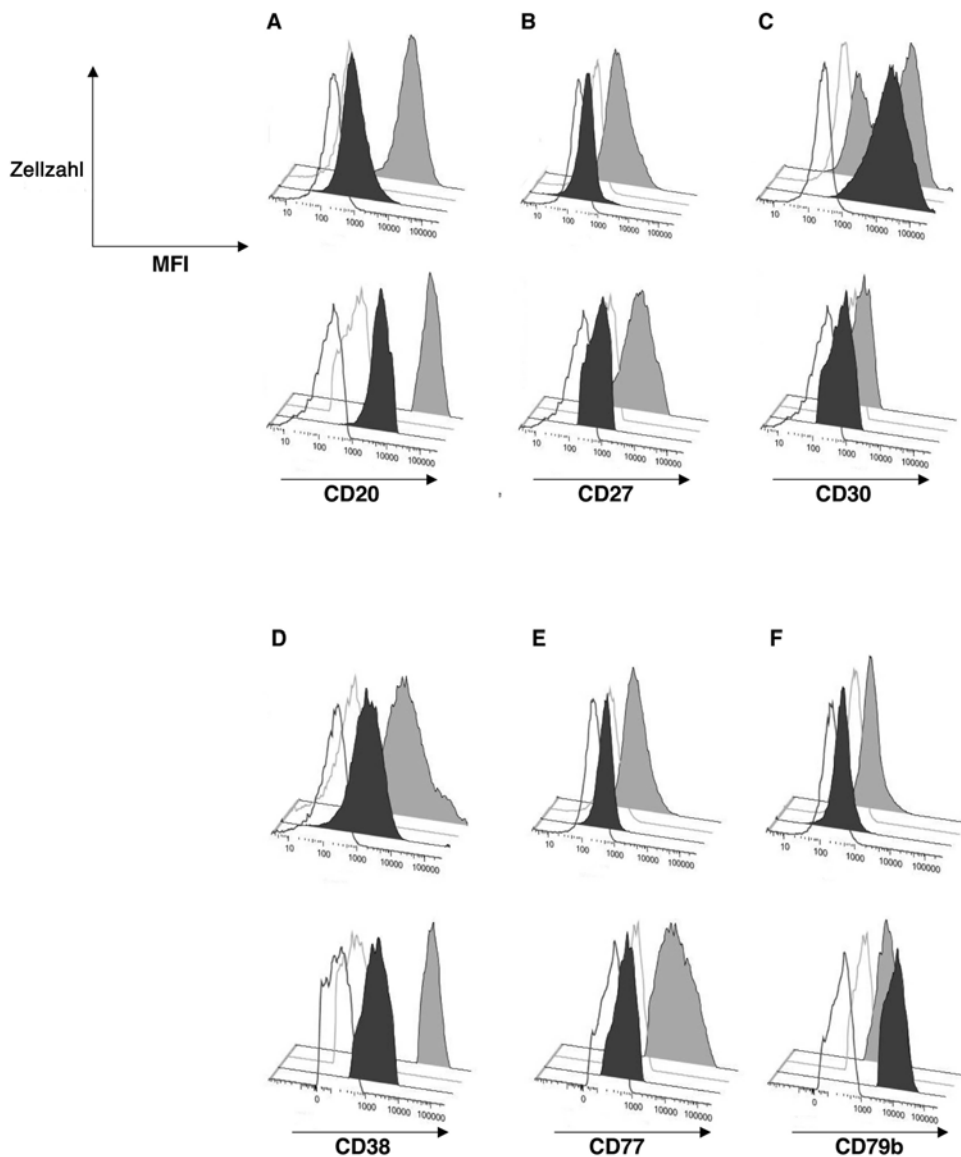


Abb. 15: FACS-Analyse der Expression ausgewählter Oberflächen-Marker. Die oberen Reihen zeigen exemplarisch zwei LCLs mit verschiedenen Färbeintensitäten; A) CD20, schwarz: GC-LCL 5-7-1, grau: N-LCL B1-59; B) CD27, schwarz: GC-LCL 5-B4, grau: GC-LCL 6-28; C) CD30, schwarz: GC-LCL 6-28, grau: GC-LCL 7-85 (Unterpulationen mit schwacher und starker Expression); D) CD38, schwarz: GC-LCL 5-7-1, grau: GC-LCL 5-5-1; E) CD77, schwarz: GC-LCL 6-16, grau: GC-LCL 4-17; F) CD79b, schwarz: GC-LCL 5-7-1, grau: GC-LCL 5-5-1. Die unteren Reihen zeigen die Marker-Expression in primären naiven (schwarz) und GC-B-Zellen (grau); die Analyse der Expression in den primären B-Zellen wurde mit einer Zwei-Farben-Färbung durchgeführt. Hierbei wurden die naiven als CD27-negativ und die GC-B-Zellen als stark CD38-positiv ausgewählt. Die Haarlinien zeigen die ungefärbten und die ausgefüllten Histogramme die gefärbten Populationen.

Tabelle 8: Ausprägungsstärken ausgewählter Oberflächen-Marker in monoklonalen LCLs und primären B-Zellpopulationen.

	Zellen/ Zelllinien	CD20	CD27	CD30 (% der Zellen)	CD38	CD77	CD79b
Primäre GC-B-Zellen		+++	++	-	+++	++	++
Ig-verkrüppelte GC-LCLs	4-17	++	++	++	++	++	-
	5-7-1	+	+	+++	++	- ^a	-
	7-85	++	+	+ (34) +++ (66)	+++	+	- ^a
sIg-negative GC-LCLs	5-5-1	++	+	++ (22) +++ (78)	+++	+	+
	5-B4	++	-	+++	++	+	+
	6-28	++	++	+++	++	- ^a	-
sIg-positive GC-LCLs	5-2-2	++	+	++ (16) +++ (84)	+++	-	+
	5-B8	++	+	++ (13) +++ (87)	+++	- ^a	+
	6-16	++	+	++ (18) +++ (82)	+++	- ^a	+
Primäre naive B-Zellen		++	-	-	++	-	++
sIg-positive N-LCLs	B1-18	++	+	++ (11) +++ (89)	+++	+	+
	B1-40	++	+	++ (37) + (63)	+++	+	+
	B1-59	+++	+	++ (93) + (7)	+++	+	+

Mittlere Fluoreszenz-Intensitäten (MFI) minus die Auto-Fluoreszenzen der individuellen Zelllinien. - MFI <100, + 100 <MFI <1000, ++ 1000 <MFI <10000, +++ 10000 <MFI <100000. ^a Die Färbung dieser Linie für diesen Marker zeigt eine MFI minus die Auto-Fluoreszenz zwischen 100 und 1000, jedoch ähnlich der entsprechenden Isotyp-Kontrolle. Die Linie ist daher für diesen Marker negativ. Die Primärdaten dieser FACS-Färbungen sind in Tabelle A5 aufgeführt.

Die Aktivierung eines weiteren GC-B-Zellmarkers, CD77, in N-LCLs konnte in einer früheren Studie in LCLs aus unseparierten PB-B-Zellen nicht detektiert werden (Gregory et al., 1988). Es ist jedoch möglich, dass die LCLs in dieser Studie zum grössten Teil aus Gedächtnis-B-Zellen stammten (s. 3.2.1) und daher mit den monoklonalen N-LCLs in der vorliegenden Arbeit nicht vergleichbar sind. Die starke Herabregulation von CD77 in allen bis auf einer GC-LCLs hingegen bestätigte diese und eine weitere Studie (Gregory et al., 1988; Mangeney et al., 1995) (Abb. 15E, obere Reihe). Fünf von neun GC-LCLs blieben bei dieser Analyse vollständig CD77⁻ (Tabellen 8 und A5). In zwei der sechs Oberflächen-IgL⁻ GC-LCLs wurde eine schwache CD79b (Igβ)-Ausprägung gefunden (Abb. 15F, obere Reihe). Igβ kann bis zu einem gewissen Grad auch BCR-unabhängig exprimiert werden (Kremyanskaya und Monroe, 2005). Die BCR-verkrüppelten und eine der sIg⁻ GC-LCLs blieben Igβ⁻. Die übrigen LCLs zeigten eine nur schwache Igβ-Ausprägung.

Die Ausprägung von AID in allen LCLs hat kürzlich erschienene Arbeiten bestätigt (Gil et al., 2007; He et al., 2003; Tobollik et al., 2006). Die Ausprägungsstärken variierten jedoch sehr stark in den LCLs (Abb. 16). Der GC-B-Zellmarker BCL-6 wird in keiner LCL exprimiert. Es ist bekannt, dass LMP1 und EBNA2 BCL-6 herabregulieren (Boccellato et al., 2007; Cattoretti et al., 1997). Die fehlende BCL-6-Ausprägung in den Linien ist somit übereinstimmend mit einer Latenz III-assoziierten Herabregulation von BCL-6. Die BCR-Signal-vermittelnde Kinase SYK und die B-Zell-spezifischen TF PU.1 und EBF werden in nahezu allen LCLs ausgeprägt (Abb. 16). Eine der N-LCLs exprimiert kein SYK und scheint unabhängig vom BCR-Signal zu wachsen. PU.1 wird in den normalen B-Zellpopulationen stärker ausgeprägt und scheint durch EBV in den LCLs herabreguliert. Die Ausprägung von EBF schwankt in den untersuchten LCLs. Die meisten zeigen jedoch auch bei diesem TF eine Herabregulation der Ausprägung im Vergleich zu den primären B-Zellpopulationen. Eine N-LCL ist EBF-negativ. Erstaunlicherweise exprimierten acht von neun GC-LCLs den T-Zell-spezifischen TF GATA3 (Abb. 16). GATA3 wird im HL aberrant ausgeprägt.

In den vier unterschiedlichen Arten von LCLs (BCR-verkrüppelte, BCR⁻, BCR⁺ GC-LCLs und BCR⁺ N-LCLs) gab es bis auf die fehlende Ausprägung von Igβ in den BCR-verkrüppelten und einer BCR⁻ GC-LCL sowie die Aktivierung von GATA3 in ausschliesslich GC-LCLs keine konsistenten Unterschiede. Die Aktivierung der B-Zell-Differenzierungsmarker CD27, CD77, CD38 und AID in den N-LCLs zeigt, dass die Ausprägung der Latenz III-assoziierten Genprodukte von EBV in der Lage ist, normale B-Zell-Differenzierungsmuster umzuschreiben. Es ist daher nahezu unmöglich, die Herkunft der verschiedenen LCLs phänotypisch zu bestimmen.

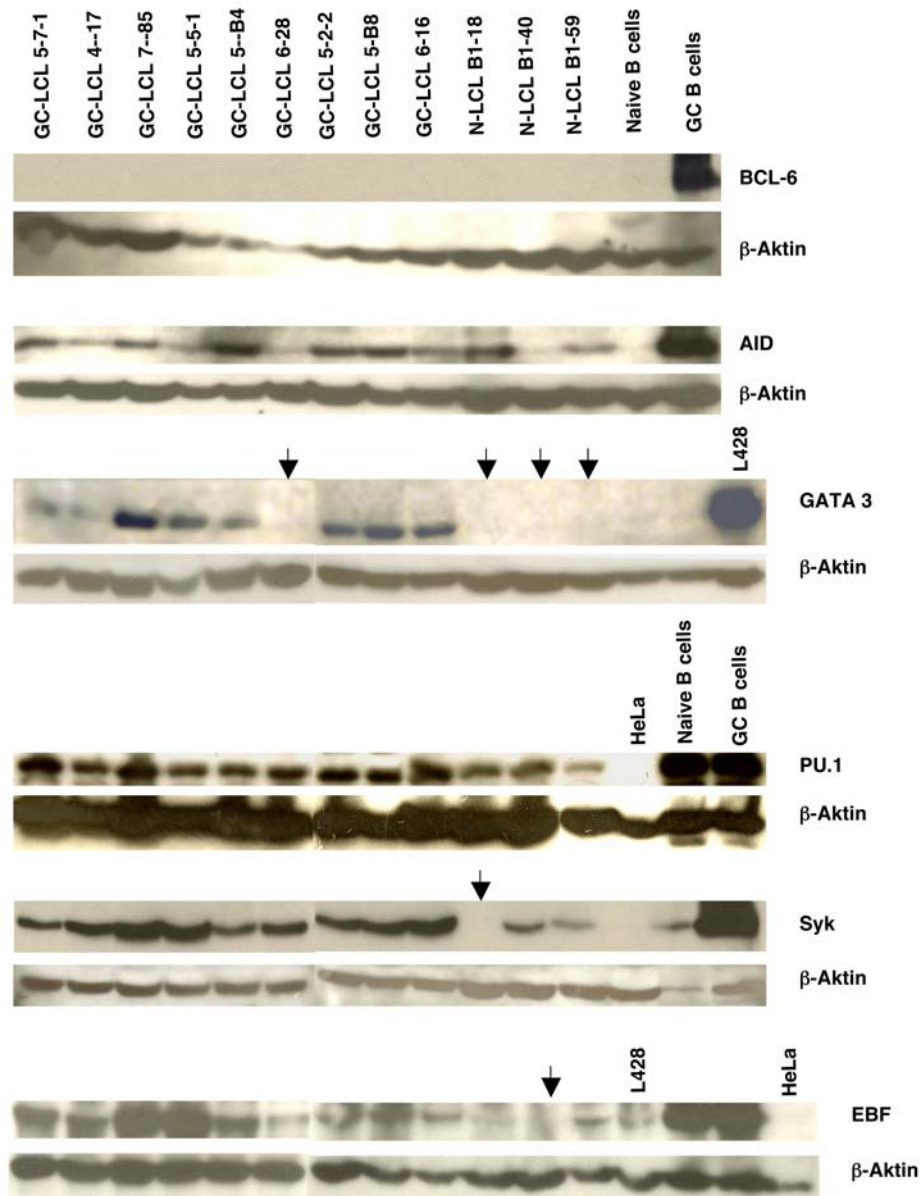


Abb. 16: Western Blot Analyse der B-Zell-Differenzierungsmarker. Die Expression von β -Aktin dient als Ladekontrolle. Normale GC-B-Zellen dienen als Positiv-Kontrolle und normale naive B-Zellen als Negativ-Kontrolle von AID und BCL-6. Die HL-Zelllinie L428 ist als Positiv-Kontrolle und normale GC- und naive B-Zellen sind als Negativ-Kontrolle der GATA3-Ausprägung gezeigt. PU.1, SYK und EBF werden durch normale GC- und naive B-Zellen positiv und durch die Zervixkarzinom-Zelllinie HeLa negativ kontrolliert. Die sichtlich schwache Ausprägung von SYK in normalen naiven B-Zellen ist vermutlich durch das Laden von weniger Protein entstanden (siehe auch die β -Aktin Kontrolle). Die Pfeile verdeutlichen die für die analysierten Proteine jeweils negativen LCLs. Bei BCL-6 sind alle LCLs negativ.

Die Herabregulation der B-Zell-spezifischen TF PU.1, EBF und BCL-6, der Oberflächenmarker CD27, CD77 und CD79b sowie des Differenzierungsproteins AID und die aberrante Ausprägung von GATA3 in den GC-LCLs weist auf eine wichtige Rolle von

EBV bei der Entwicklung des HRS-Phänotyps in GC-B-Zellen hin. Die Ausprägung von CD20 und CD38 sowie das Fehlen von BCL-6 ist zudem eine Übereinstimmung mit dem Expressionsmuster EBV-assoziiierter PTLD-Fälle (Timms et al., 2003).

3.4 Der Einfluss von EBV auf die SHM

Während der GC-Reaktion kann AID eine genomische Instabilität initiieren, die zu einem erhöhten Risiko der malignen Transformation einer B-Zelle führt. Einige PTLD-Fälle zeigen sogar eine fortlaufende SHM-Aktivität im Tumorklon (Bräuninger et al., 2003; Capello et al., 2003; Timms et al., 2003). Die in dieser Arbeit etablierten monoklonalen LCLs prägen AID aus. Die Ausprägung des Proteins korreliert jedoch nicht immer mit der Aktivität der SHM. Tatsächlich wird die Induktion der SHM durch EBV kontrovers diskutiert (Gil et al., 2007; Harris et al., 2001; Tobollik et al., 2006). Um die Frage zu klären, ob EBV auf die Aktivität der SHM Einfluss nimmt und dadurch evtl. die genomische Integrität der B-Zellen gestört werden kann, wurden 27 monoklonale LCLs, inklusive der drei N-LCLs und drei BCR-verkrüppelten, auf die Aktivität der SHM in vitro untersucht. Von allen LCLs wurden 8-21 individuelle Klone von $V_H D_H J_H$ -PCR-Produkten auf intraklonale Sequenzunterschiede als Zeichen einer fortlaufenden SHM während der klonalen Expansion in Kultur analysiert.

Insgesamt wurden 46 Mutationen in 116.372 sequenzierten bp gefunden (Tabelle 9). Diese Sequenzunterschiede werden innerhalb der monoklonalen LCLs nicht von allen Klonen geteilt, sondern stellen individuelle Punktmutationen eines PCR-Produkt-Klons zu der gemeinsam verwendeten Sequenz der monoklonalen LCL dar. Zur Bestimmung der SHM-Aktivität in individuellen LCLs wurden die jeweils gefunden Mutationen, der über den sequenzierten Bereich erwartete DNA-Polymerase-Fehler (siehe 2.6) sowie die Häufigkeit von Mutationen an der AID-Zielstruktur des WRC-Motifs in die Analyse mit eingeschlossen. Von den 24 GC-LCLs haben 13 die SHM-Aktivität vollständig eingestellt und nur vier GC-LCLs zeigen eine intraklonale Diversität, die den erwarteten DNA-Polymerase-Fehler verlässlich, d. h. mehr als zweifach, übersteigt (Tabelle 9). In drei von diesen mutierenden GC-LCLs wurden einige (GC-LCL 2-31, GC-LCL 7-85) bzw. alle (GC-LCL 6-2) Punktmutationen an der AID-Zielstruktur eingeführt. Die monoklonale N-LCL B1-18 zeigte ebenfalls mit 9 Mutationen, davon drei in AID-Zielstrukturen, in 8 von 21 Sequenzen eine schwache intraklonale Diversität innerhalb des ursprünglich unmutierten N-LCL-Klons (Tabellen 7 und 9). EBV induziert somit nicht nur AID in N-LCLs, sondern kann auch die SHM aktivieren und so zu Mutationen in $V_H D_H J_H$ -Genumlagerungen führen.

Tabelle 9: Analyse der SHM in monoklonalen GC- und N-LCLs.

Zelllinie	V _H -Gen	Mutations-Frequenz der gemeinsamen Mutationen (%) ^e	Anzahl der Sequenzen	Anzahl der intraklonalen Sequenz-Unterschiede ^f
GC-LCL 2-12	VH1-46 if	4.4	11	0
GC-LCL 2-14	VH3-9 if	0	10	0
	VH4-39 oof	0	8	0
GC-LCL 2-31 ^b	VH3-7 if	1.6	19	1 x 1, 1 x 5 (1.5)
GC-LCL 2-36	VH3-9 if	0.6	10	0
GC-LCL 2-50	VH1-2 nf	1.3	13	0
	VH2-5 if	0.6	10	0
GC-LCL 4-4	VH3-33 if	5.1	10	0
GC-LCL 4-8 ^b	VH3-23 if	3.5	11	1 x 1, 1 x 2, 1 x 3 (0.9)
	VH3-74 if	4.1	3	0
GC-LCL 4-16	VH3-9 if	0.5	7	0
	VH4-4 oof	0.5	10	0
GC-LCL 4-17	VH3-48 cr	6.0	16	1 x 1
GC-LCL 4-18	VH2-5 if	2.1	8	0
GC-LCL 4-21	VH3-9 if	6.7	9	1 x 1
GC-LCL 4-22	VH3-33 if	2.1	15	1 x 1
GC-LCL 4-23	VH3-15 if	5.1	9	0
GC-LCL 4-26	VH3-23 if	0	9	0
GC-LCL 5-12-1 ^c	VH4-59 if	3.1	18	3 x 1 (1.5)
GC-LCL 5-B11 ^c	VH4-59 if	4.0	10	0
GC-LCL 5-B3 ^d	VH4-39 if	3.1	10	0
GC-LCL 5-B7 ^d	VH4-39 if	4.0	18	2 x 1 (1.6)
GC-LCL 5-7-1	VH4-59 cr	1.4	10	1 x 1
GC-LCL 6-2 ^b	VH1-46 if	4.8	16	1 x 2, 2 x 1 (1.7)
GC-LCL 6-8	VH1-8 if	2.2	10	0
GC-LCL 6-16	VH3-30 if	1.5	9	0
GC-LCL 6-38	VH3-15 if	4.2	10	0
	VH5-51 oof	9.0	14	1 x 1
GC-LCL 7-85 ^b	VH3-48 cr	1.0	16	3 x 1, 1 x 2 (2.2)
N-LCL B1-18 ^b	VH3-23 if	0	21	7 x 1, 1 x 2 (2.4)
	VH3-64 nf	0	6	0
N-LCL B1-40	VH3-21 if	0	16	4 x 1 (2.0)
N-LCL B1-59	VH3-23 if	0	14	2 x 1 (1.8)

^a Die GC-LCLs 2-12, 2-14, 2-31, 2-36 und 2-50 sind im Rahmen meiner Diplomarbeit etabliert worden; ^b Zelllinien mit mehr als zweifachem Unterschied in der Anzahl der Mutationen zu den erwarteten PCR-Fehlern; ^c verwandte Zelllinien mit 5 Nukleotid-Unterschieden; ^d verwandte Zelllinien mit 7 Nukleotid-Unterschieden; ^e basierend auf der direkten Sequenzierung der LCL-DNA; ^f Die Zahl in Klammern zeigt die individuell erwarteten PCR-Fehler; if entspricht im Leseraster (engl. in-frame), oof entspricht aus dem Leseraster (engl. out-of-frame), nf entspricht nicht funktionell, cr entspricht verkrüppelt (engl. crippled).

Die 16 Sequenzunterschiede in insgesamt 84.145 sequenzierten bp der 22 als nicht-mutierend eingestuften LCLs könnten aus mehreren Gründen eher durch DNA-Polymerase-Fehler als durch SHM eingeführt worden sein. Der erwartete DNA-Polymerase-Fehler für diesen sequenzierten Bereich liegt bei 25,8 und die Mutationen in den individuellen LCLs ähneln den individuell-errechneten DNA-Polymerase-Fehlern. Weiterhin sind nur 2 der 16 Sequenzunterschiede innerhalb der AID-Zielstruktur, jedoch handelt es sich bei 8 von 16 Mutationen um typische Taq-DNA-Polymerase-Fehler, wie z.B. A zu G bzw. T zu C Transitionen (Keohavong und Thilly, 1989).

3.5 Etablierung einer Methode zur Aufreinigung EBV⁺ B-Zellen aus dem PB gesunder Blutspender

Zur Aufklärung der Frage, warum ein normalerweise harmloses Virus in seltenen Fällen die Entwicklung von B-Zell-Lymphomen fördert, ist es essentiell den normalen Lebenszyklus und die Etablierung der Persistenz von EBV zu verstehen. Da die EBV-assoziierten B-Zell-Lymphome aus GC-B-Zellen stammen, ist u.a. die Interaktion von EBV mit der GC-Reaktion der B-Zellen von grosser Bedeutung. Diese Interaktion und damit verbunden auch der zelluläre Ursprung der EBV⁺ Zellen in der Persistenz werden kontrovers diskutiert. Es wird einerseits angenommen, dass EBV zur Etablierung der viralen Persistenz die normalen B-Zell-Differenzierungsstadien ausnutzt (Thorley-Lawson, 2005). Andererseits wurde gezeigt, dass EBV-positive B-Zellen nur selten im GC zu finden sind, und dass tonsilläre EBV-infizierte B-Zellen während der IM nicht an einer normalen GC-Reaktion teilnehmen (Araujo et al., 1999; Kobayashi et al., 1998; Kurth et al., 2003; Kurth et al., 2000). Die latent EBV-infizierten Zellen im PB konnten durch ihre Seltenheit von 1-10 in 10⁶ B-Zellen noch nie direkt analysiert werden. Bisherige Untersuchungen dieser Zellen beschränkten sich daher ausschliesslich entweder auf eine Analyse der latenten EBV-Transkripte nach FACS-Sortierungen von PB-B-Zellen und LD dieser Zellen oder auf die Isolierung EBV⁺ PB-B-Zellen von IM-Patienten, die eine erhöhte Frequenz EBV⁺ Zellen (bis zu 50% der Gedächtnis-B-Zellen) im Blut aufweisen (Babcock et al., 1998; Souza et al., 2005). Die Entwicklung einer verlässlichen Methode zur Einzelzell-Isolierung und direkten DNA-Analyse der seltenen EBV⁺ B-Zellen von gesunden Blutspendern gibt möglicherweise detaillierte Hinweise auf die offenen Fragen der viralen Persistenz-Entwicklung.

Die Isolierung der EBV⁺ B-Zellen erfolgte zunächst aus BC-Spenden (Tabelle 10) und später aus 500 ml Vollblutspenden eines gesunden und bekannten Blutspenders, so dass ggf. zu einem späteren Zeitpunkt von dem gleichen Spender erneute Blutproben genommen werden können. Die Detektion der EBV⁺ B-Zellen findet über eine EBER-ISH statt, da die

EBER-Transkripte mit bis zu 10^7 Molekülen pro Zelle in jeder EBV-infizierten B-Zelle zu finden sind (Khan et al., 1992). Die B-Zellen wurden über eine CD19-MACS-Isolierung aufgereinigt. Die isolierten B-Zellen wurden dann in Suspension mit 4% PFA/5% Essigsäure in PBS, u.a. zum Lösen der EBER-Sekundärstrukturen, fixiert. Die EBER-ISH erfolgte mit einer FITC-markierten Sonde in Suspension. Die Zellen wurden nach der ISH auf Objektträgern ausgestrichen und getrocknet. Zur Erleichterung der Detektion und Isolierung positiver Zellen wurde die Sonde mit einer a-FITC-AP-Färbung und FastRed-Entwicklung sichtbar gemacht. Einzelzellen wurden anschließend mittels Mikrodissektion isoliert und mit einer Zwei-Runden-PCR analysiert. Es wurden in der zweiten Runde der PCR nur Zellen auf V_H -/ V_L -Genverbindungen analysiert, die zur Validierung der EBV-Infektion in der zweiten Runde der EBNA1-PCR im Vorfeld ein Produkt gezeigt haben.

Die Einzelzell-Analyse hydraulisch- und Laser-isolierter EBV^+ B-Zellen beinhaltet die Gefahr, dass evtl. nicht-gefärbte Zellen und Zellfragmente mit den EBV^+ Zellen gemeinsam isoliert werden. Eine mögliche positive V-Gen-PCR aus der DNA dieser nicht-gefärbten, EBV^- Zellfragmente verfälscht die Ergebnisse. Als Kontrolle und zur Abschätzung der evtl. Kontaminationsfrequenz der isolierten EBV^+ B-Zellen mit EBV^- B-Zell-DNA wurden daher EBV^+ Zellen eines Zellgemisches monoklonaler EBV^+ und EBV^- Zelllinien mit bekannten $V_H D_H J_H$ -Genumlagerungen auf die gleiche Weise isoliert und analysiert. Die EBV^+ GC-LCL 5-7-1 (V_H4 -Genverbindung) wurde zu diesem Zweck mit der EBV^- BL41 (V_H3 -Genverbindung) in einem Verhältnis von $1:10^5$ gemischt, um eine der natürlichen EBV-Persistenz ähnelnde Frequenz EBV^+ unter EBV^- Zellen zu simulieren.

3.5.1 Protokoll-Varianten

Fixierung:

Die EBER-Genprodukte liegen hauptsächlich als Sekundärstrukturen mit teilweise komplementär-gepaarten Basenpaarungen vor. Die 5% Essigsäure im Fixierungspuffer sorgen dafür, dass diese Sekundärstrukturen aufgelöst werden und die EBER-Sonde im nächsten Schritt die Möglichkeit hat mit den EBER-Transkripten zu hybridisieren. Eine Fixierung mit Essigsäure erhöht jedoch auch die Wahrscheinlichkeit eines Säure-bedingten Basenverlustes auf der DNA und die Effizienz der Einzelzell-PCR verringert sich. Es war daher wichtig, die kürzeste Fixierungszeit zu finden, die zum Auflösen einer detektionsfähigen Anzahl der EBER-Sekundärstrukturen führt, jedoch die Effizienz der Einzelzell-PCR nicht zu stark beeinträchtigt. Die Fixierungszeit wurde von 20 Min. bei den ersten zwei Spendern auf 12 Min. ab dem 3. Spender verringert. Zusätzlich wurde der Fixierungspuffer über zwei Waschschrte anstelle von einem aus den Zellen gewaschen.

Zwei-Runden-PCR:

Bei den ersten zwei Spendern wurden bei der Zwei-Runden-PCR die V_{HL} - und V_L -Primer in Kombination mit den entsprechenden J-Primern sowie zur Validierung der EBV-Infektion die EBNA1-Primer verwendet (Tabelle 10 und A1). Bei diesen isolierten Zellen lag die EBNA1-PCR-Effizienz zunächst bei ca. 50% und verringerte sich auf 25-30% während der Lagerungszeit vermutlich durch DNA-Degradierung. Frisch-isolierte Zellen vom Spender C zeigten wieder eine EBNA1-PCR-Effizienz von ca. 50%. Die aufwendige Zellisolierung und -analyse verursacht eine relativ lange Lagerungszeit der übrigen Objektträger bei RT. Ein Einfrieren der Objektträger erhöht das Risiko, dass Zellen aufplatzen und DNA über den Objektträger verteilt wird. Um die PCR-Effizienz möglichst stabil zu halten, wurden bei Spender 3 die V_{HL} -Primer durch V_{H-FR} I-Primer ausgetauscht. Die V_{H-FR} I-Primer ergeben ein um 200 bp kürzeres PCR-Produkt. Ein kürzeres PCR-Produkt erhöht die Chance ein intaktes V_H -Fragment, ohne Basenverluste durch die Säure-Fixierung der Zellen oder eine längere Lagerung der Objektträger, amplifizieren zu können. Die Effizienz der V-Gen-PCR der EBNA1-PCR-positiven Zellen hat sich dadurch bei Spender C verdoppelt.

Mikrodissektion:

Bei der hydraulischen Mikrodissektion wurden die positiven Zellen mit Tris-Puffer bedeckt und durch angeschliffene Glaskapillaren aufgesogen. Von den Objektträgern der ersten zwei Spender wurden Zellen über einen Zeitraum von 6 Monaten isoliert und die Objektträger in dieser Zeit bei RT gelagert. Die Zellen waren daher fest angetrocknet und die isolierten Puffer-Kontrollen blieben mit je einer Ausnahme in der PCR negativ (Tabelle 10). Bei diesen zwei positiven Pufferkontrollen der Spender A und B handelte es sich um eine V_K - bzw. eine V_λ -Genverbindung. Die V_λ -positive Pufferkontrolle von Spender B war zudem EBNA1-PCR-positiv, was evtl. auf eine sporadische PCR-Produkt-Kontamination zurückzuführen ist. Bei Spender C war keine der 29 Pufferproben der hydraulischen-Mikrodissektion EBNA1-, V_H - oder V_L -PCR-positiv. Weitere Versuche der Isolierung EBV⁺ Zellen dieses Spenders führten jedoch regelmässig zu ein bis zwei V-Gen-PCR-positiven Pufferkontrollen. Um die Gefahr von kontaminierenden Zellen bzw. Zellfragmenten im Puffer zu umgehen und um eine möglichst hohe EBNA1- und V-Gen-PCR-Effizienz zu erreichen, wurden die Zellen bei einer weiteren Blutspende des Spenders C auf Membran-Objektträgern ausgestrichen und trocken mittels eines PALM-Laser-Mikromanipulators aus der Membran geschnitten und in die Reaktionsgefässe katapultiert (Abb. 17A-C). Parallel zu den fünf Laser-mikrodissektierten EBV⁺ Zellen des Spenders C wurden 10 Membrankontrollen isoliert (Tabelle 10 und Abb. 17F). Keine dieser 10 Kontrollen ergab

ein EBNA1-, V_H - oder V_L -PCR-Produkt. Die Probleme abschwimmender Zellfragmente bei der hydraulischen Mikromanipulation scheinen somit durch die Anwendung der PALM-Laser-Mikromanipulation erfolgreich umgangen zu werden. Die EBNA1-PCR-Effizienz lag in diesem Experiment bei 28% und die V-Gen-PCR-Effizienz bei 62,5%.

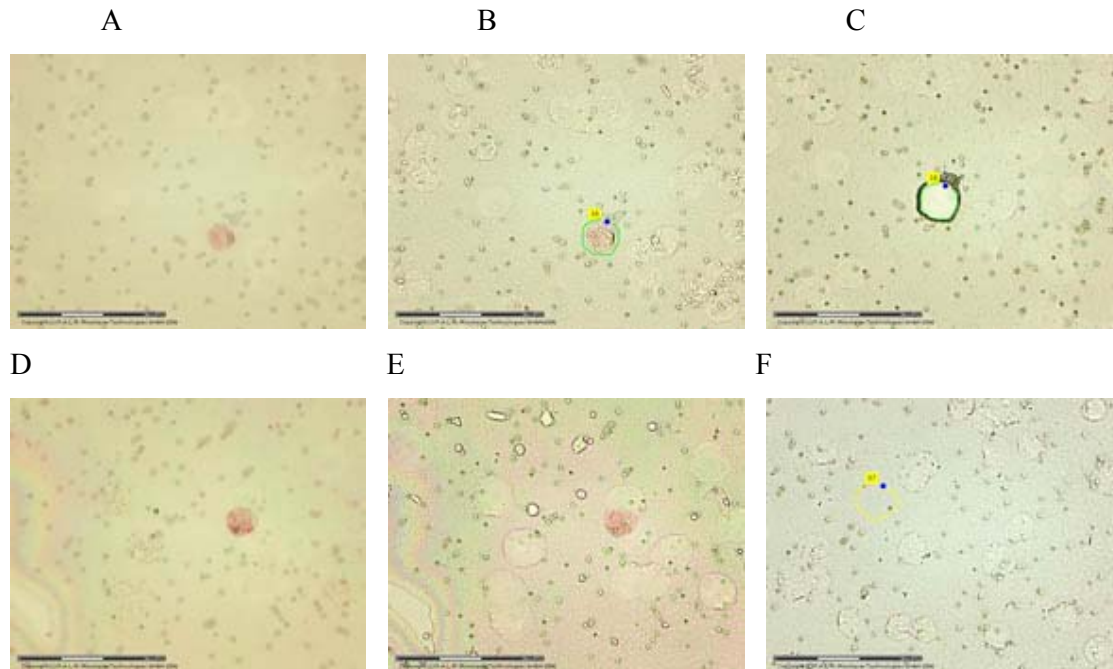


Abb. 17: Isolierung EBV⁺ B-Zellen mittels Laser-Mikrodissektion. A-C) EBV⁺ Zelle vor der Isolierung (A, B) und nach der Isolierung (C); D und E) EBV⁺ Zelle, die im Zellkomplex mit EBV⁻ Zellen liegt und aus diesem Grund verworfen wurde; F) Beispiel für die Auswahl einer Membran-Kontrolle; A und D) Blick durch den Diffusor des Mikromanipulators; B, C, E und F) Blick durch den Deckel des Reaktionsgefäßes; Zellkonturen sind durch den Deckel leichter zu erkennen. Im Hintergrund sind die für Membran-Objektträger typischen kleinen Blasen zu sehen.

Von 28 hydraulisch-isolierten EBV⁺ Kontrollzellen der GC-LCL 5-7-1 in einem EBV⁻ BL41-Zellgemisch von $1:10^5$ waren in der PCR-Analyse 7 Zellen (25%) EBNA1⁺. Drei der Zellen ergaben zudem ein korrektes V_H4 -Genprodukt. Fünf der 28 isolierten Zellen zeigten das falsche V_H3 -Genprodukt der EBV⁻ BL41. Jedoch keine dieser fünf Zellen war EBNA1-PCR⁺. Dieses Ergebnis spricht eher dafür, dass fälschlicherweise auch Färbeartefakte isoliert wurden, als dafür, dass EBV⁻ Zellen in Kombination mit EBV⁺ Zellen mikromanipuliert wurden. Bei der Laser-Mikromanipulation waren 16 (23%) von 70 isolierten Kontrollzellen EBNA1-PCR⁺. Alle 16 Zellen ergaben auch das korrekte V_H4 -Genprodukt der GC-LCL 5-7-1. Zwei dieser 16 Zellen zeigten jedoch zusätzlich das V_H3 -Genprodukt der BL41. Dies deutet darauf hin, dass in diesen zwei Proben Zellfragmente der BL41 mit einer EBV⁺ Zelle aus der Membran isoliert wurden, und unterstreicht die Wichtigkeit und Sensitivität dieses

Kontrollexperimentes. Es werden zukünftig nur EBV⁺ Zellen mikromanipuliert, die frei von EBV⁻ Zellen auf der Objektträgermembran vorliegen (Abb. 17D, E).

Tabelle 10: Charakterisierung EBER⁺/EBNA1-PCR⁺ PB-B-Zellen von drei gesunden Virus-Trägern.

Spender	Anzahl der EBER ⁺ /EBNA1-PCR ⁺ PB-B-Zellen	Mutationsstatus	Auffälligkeiten der EBV ⁺ Zellen
A ^a	24 ^c	6 x unmutiert 13 x mutiert 5 x undefiniert ^e	
B ^a	22 ^c	3 x unmutiert 16 x mutiert 3 x undefiniert ^e	2 Klone mit jeweils 4 Mitgliedern
C ^b	19 ^d	1 x unmutiert 15 x mutiert 3 x undefiniert ^e	1 Zelle mit einer BCR- verkrüppelnden Mutation

^a Die Zellen stammen aus einem BC eines unbekannten Spenders; ^b Die Zellen stammen aus einer Vollblutspende eines bekannten Spenders; ^c Hydraulisch-mikrodissektierte Zellen; ^d Hydraulisch- und Laser-mikrodissektierte Zellen; ^e Diese Zellen tragen unmutierte V_κ-Genverbindungen. In λ-exprimierenden Zellen wird die Ausprägung der vorher rearrangierten κ-Genumordnungen häufig durch die Rekombination des κ-deletierenden Elementes abgeschaltet (Bräuninger et al., 2001). Die V_κ-Genverbindungen sind dann entweder deletiert oder nehmen durch eine fehlende Transkription an der SHM der Zelle nicht mehr teil. Eine Aussage über den Mutationsstatus der Zellen mit unmutierten V_κ-Genverbindungen ist daher nicht möglich.

3.5.2 Charakterisierung EBV⁺ B-Zellen aus dem PB drei gesunder Spender

Die Analyse der ersten EBV⁺ Zellen von drei Spendern zeigte, dass die aufwendige Isolierungs-Methode funktioniert. Insgesamt waren bei den Spendern A-C 100 von 217 (46%), 75 von 193 (39%) bzw. 35 von 106 (33%) isolierten Zellen EBNA1-PCR⁺. Die Untersuchung dieser EBNA1-PCR-positiven Zellen führte zu 24 (24%), 22 (29%) bzw. 19 (54%) Zellen mit V_H- bzw. V_L-Genverbindungen. In allen drei Spendern wurden sowohl mutierte als auch unmutierte V-Genverbindungen gefunden (Tabelle 10). Erstaunlicherweise waren bei Spender B zweimal je vier Zellen klonal verwandt. Dies weist auf eine klonale Expansion EBV-infizierter B-Zellen hin und deutet an, dass das Reservoir von EBV möglicherweise oligoklonal ist. Bei Spender C wurde eine Zelle mit einer BCR-destruktiven Punktmutation in einer ursprünglich funktionellen V_HD_HJ_H-Genverbindung gefunden. Dies könnte bedeuten, dass EBV in der Lage ist, in vivo prä-apoptotische GC-B-Zellen gesunder

Menschen zu retten und ihr Überleben in der Peripherie zu ermöglichen. Das zweite Allel dieser Zelle wurde nicht amplifiziert. Die Wahrscheinlichkeit, dass diese Zelle eine zweite funktionelle $V_H D_H J_H$ -Genverbindung besitzt, ist sehr gering, aber nicht auszuschließen. Die Isolierung und Analyse weiterer EBV^+ Zellen von Spender C sowie von neuen Spendern ist zur Validierung dieser ersten Ergebnisse essentiell.

Spendersuche:

Die Frequenz EBV^+ B-Zellen im PB liegt zwischen 1-10 in 1×10^6 B-Zellen. Bei der Isolierung dieser seltenen EBV^+ Zellen ist ein Faktor 10 Unterschied in der Frequenz ausschlaggebend für eine erfolgreiche Aufreinigung mit möglichst wenig Färbeartefakten und einer hohen Zellausbeute. Die Aufreinigung EBV^+ Zellen von weiteren Blutspendern ergab, dass die Frequenz EBV^+ Zellen bei den meisten Spendern eher am unteren Limit des Frequenz-Spektrums lag. Eine effiziente Isolierung der Zellen war bei diesen Spendern nicht möglich. Um Spender zu identifizieren, die 5-10 EBV^+ Zellen in 1×10^6 B-Zellen tragen, wurde eine LD von PB-B-Zellen in Verbindung mit einer Endpunkt-PCR von zehn bekannten Blutspendern durchgeführt (Tabelle 11). Diese LD-Endpunkt-PCR führt zu statistisch-untermauerten individuellen Frequenzen EBV^+ B-Zellen im PB.

Tabelle 11: Anteil der EBV-PCR-negativen Proben pro Zellverdünnung in 9 Blutspendern.

Zellzahl	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1^+ Zelle ^a
5×10^4	na	0,4	0,6	na	na	na	0,9	na	na	0,37
1×10^5	0,9	0,7	0,7	0,8	0,8	1	0,8	1	1	0,37
2×10^5	0,9	0,1	0,3	0,9	0,9	0,9	0,9	1	0,9	0,37
5×10^5	0,6	0 ^b	0 ^b	0,7	0,5	0,4	0,1	0,8	1	0,37

^a Diese Spalte gibt den statistischen Wert an, bei dem 1 Zelle der Zellproben EBV-positiv ist. Die Gerade der Werte dieser Spalte schneidet in Abb. 18 die Geraden der Spender bei genau der Zellzahl mit 1 EBV^+ Zelle; ^b bei den Spendern 2 und 3 waren alle 5×10^5 Zellproben positiv. Da der \ln von 0 nicht definiert ist, tauchen diese Zellproben in der Abb. 18 nicht auf; na steht für nicht analysiert.

Bei einem der zehn Blutspender konnte keine EBV-Infektion nachgewiesen werden. Tabelle 11 zeigt den Probenanteil pro Zellverdünnung, der bei der EBV-PCR negativ geblieben ist. Ein negativer Probenanteil von 0,37 gibt die Zellverdünnung an, in der sich statistisch 1 EBV^+ Zelle befindet (Babcock et al., 1998). Durch die Trendlinie der negativen Zellfraktionen von neun Spendern in der semi-logarithmischen Darstellung in Abb. 18 lässt

sich die individuelle Frequenz EBV⁺ Zellen direkt ablesen. Die Spender 2, 3 und 7 zeigen eine hohe Frequenz von 1 EBV⁺ Zelle in 1×10^5 , 2×10^5 bzw. $2,8 \times 10^5$ B-Zellen. Bei den übrigen Spendern lag die Frequenz zwischen 1 EBV⁺ Zelle in $5,4 \times 10^5$ bis 1 EBV⁺ Zelle in ca. $1,2 \times 10^6$ B-Zellen oder sogar niedriger (Abb. 18).

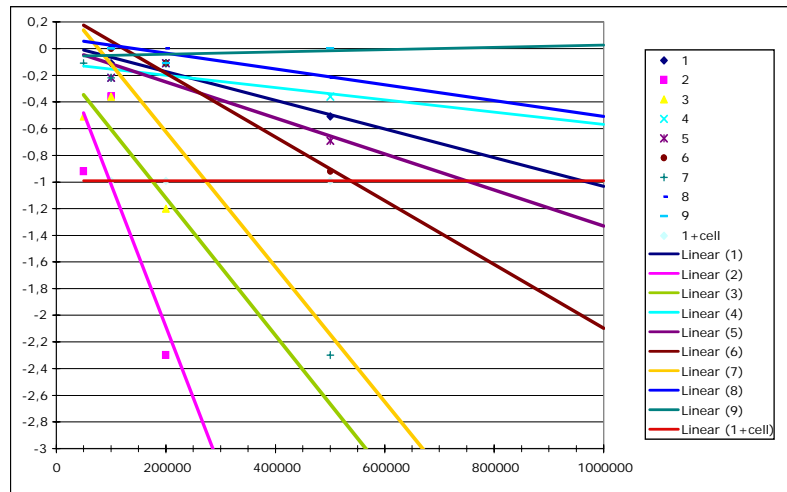


Abb. 18: Graphische Darstellung der EBV-Frequenzen in PB-B-Zellen neun gesunder Blutspender. Dargestellt sind die jeweiligen In-Werte der EBV-PCR-negativen Fraktion unterschiedlicher Zellverdünnungen von neun EBV⁺ Spendern (siehe auch Tabelle 11). Die horizontale rote Linie gibt den statistischen In-Wert von einer EBV⁺ Zelle pro B-Zellverdünnung an.

Die Seltenheit der EBV-infizierten B-Zellen sowie die komplexe Anreicherung und Detektion dieser Zellen erfordert einen hohen Verbrauch an teuren EBER-Sonden sowie eine hohe Ausgangs-Zellzahl. Aus diesen Gründen wurde die kommerziell erhältliche EBER-Sonde durch ein, mittels IVT der zwei EBER-Gene, selbst-hergestelltes EBER-Sonden-Gemisch („Anti-sense“ RNA EBER1/-2) ersetzt. Die Funktion dieser EBER-Sonde wurde mit einer EBV⁺ GC-LCLs und einer EBV⁻ BL-Zelllinie sowie mit den „Sense“-Kontrollen der IVT kontrolliert. Die EBER-Sonde funktioniert hoch-spezifisch und kann in Folge-Experimenten angewendet werden. In Zukunft werden zudem die B-Zellen über eine Leukapherese bei den drei ausgewählten Spendern 2, 3 und 7 isoliert. Eine Leukapherese führt zu einer zehnfach höheren B-Zellausbeute sowie zu einer geringeren Belastung der freiwilligen Spender, da es im Gegensatz zu einer normalen Blutspende zu keinem Verlust der wichtigen Blutbestandteile wie Thrombozyten, Erythrozyten, Granulozyten sowie des Blutplasmas kommt. Die Aufreinigung einzelner EBV⁺ Zellen aus dem PB kann mit der hier vorgestellten Methode verlässlich durchgeführt werden. Erste Ergebnisse (Tabelle 10) zeigen, dass eine DNA-Analyse per PCR nach der aufwendigen Isolierungs-Methode noch möglich ist und erstmals detaillierte Informationen über bisher nur unzureichend beschriebene seltene Zellpopulationen liefern kann.

4. Diskussion

4.1 Rettung BCR-loser GC-B-Zellen durch EBV demonstriert erstmals die essentielle Funktion des Virus in der frühen HL- und PTLD-Pathogenese

In der vorliegenden Arbeit wurde zum ersten Mal gezeigt, dass EBV humane GC-B-Zellen in vitro in stabile, langlebige Zelllinien transformieren kann. Es konnten u.a. GC-B-Zellen transformiert werden, die bereits in vivo die Fähigkeit zur Ausprägung eines BCR verloren hatten. Diese GC-B-Zellen mit BCR-destruktiven Mutationen in ursprünglich funktionellen $V_H D_H J_H$ -Genumlagerungen wären normalerweise durch ein fehlendes BCR-Signal in vivo in die Apoptose gegangen (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997). Frühere Studien haben gezeigt, dass die LMP2A-Transgen-Ausprägung in der Maus BCR-losten Vorläufer-B-Zellen ein Überleben in der Peripherie ermöglicht (Caldwell et al., 1998; Casola et al., 2004). Dieses Erkenntnis wird hier dadurch ergänzt, dass die Infektion mit EBV nicht nur humane BCR-positive GC-B-Zellen, sondern auch BCR-lose und damit bereits in vivo prä-apoptotische GC-B-Zellen vor der Apoptose retten kann.

Von den 103 monoklonalen GC-LCLs wurden 46 als Oberflächen-Ig-negativ identifiziert. Drei dieser 46 GC-LCLs zeigten eindeutig BCR-verkrüppelnde Mutationen. Eine zusätzliche GC-LCL wies eine Aminosäure-Austausch-Mutation eines konservierten Cysteins auf. Dieses Cystein wird im AK-Molekül zur Bildung einer intramolekularen Disulfid-Brücke in der V_H -Region verwendet (Edelman, 1991). Frühe biochemische Analysen von AK-Molekülen weisen daraufhin, dass die Disulfid-Brücken der AK für die Antigen-Affinität des Moleküls nahezu entbehrlich sind (Grossberg et al., 1962; Roholt et al., 1964). Die hohe Konservierung dieses Cysteins hingegen deutet auf eine eher essentielle Funktion im AK-Molekül hin. Ein Vergleich von 69 Labor-internen, funktionellen V_H -Sequenzen von selektierten IgG^+ Gedächtnis-B-Zellen und IgG^+ Plasmazellen (erhältlich innerhalb der EMBL Zugangs-Nr. FM206587-207028) hat die Konservierung dieser Aminosäure ausnahmslos bestätigt. Es bleibt somit unklar, ob die Mutation von Cystein zu Threonin die korrekte Faltung des AK-Moleküls in vivo verhindert und für die BCR-Negativität dieser Zelllinie verantwortlich ist.

Die quantitative RT-PCR-Analyse der Ig-Transkripte in acht sIg^- und drei sIg^+ GC-LCLs hat gezeigt, dass in den übrigen 42 Ig^- GC-LCLs der Verlust der BCR-Ausprägung vermutlich nicht auf transkriptioneller Ebene zu suchen ist. In diesen Zelllinien könnten hingegen Austausch-Mutationen an nicht-konservierten Aminosäuren ebenfalls zu Defekten bei der korrekten Faltung oder Paarung der IgH- und IgL-AK-Ketten geführt haben. Zudem könnten auch post-transkriptionelle Regulationsmechanismen die Ausprägung eines BCR auf der Zelloberfläche verhindern. Ein starkes LMP2A-Signal kann z.B. in der Maus für eine

Inhibition der BCR-Ausprägung sorgen (Casola et al., 2004). Zudem hat eine aktuelle Studie gezeigt, dass in LCLs über einen längeren Zeitraum in Kultur die Expression von LMP2A nicht nur den BCR ersetzen kann, sondern die LCLs sogar unabhängig ihres BCR-Zustandes vom LMP2A-Signal abhängig werden (Mancao und Hammerschmidt, 2007).

Im klassischen HL und in einigen Fällen von PTLD entstehen die Tumorzellen vermutlich aus prä-apoptotischen GC-B-Zellen, die im Verlauf der GC-Reaktion nachteilige bzw. BCR-zerstörerische Mutationen erhalten haben (Küppers, 2003). Unter normalen Umständen sterben BCR-lose B-Zellen durch Apoptose (Kraus et al., 2004; Lam et al., 1997). Die in dieser Arbeit gezeigte Rettung BCR-loser GC-B-Zellen vor der Apoptose durch EBV demonstriert eine essentielle Funktion des Virus in der frühen HL- und PTLD-Pathogenese. Die Wichtigkeit der EBV-Infektion zeigt sich zudem darin, dass obwohl nur ca. 40% der HL-Fälle EBV-positiv sind, alle Fälle mit BCR-verkrüppelnden Mutationen das Virus tragen (Bräuninger et al., 2006). Eine Ausnahme bildet evtl. die EBV⁻ HRS-Zelllinie L1236, bei der jedoch die Mutationen nicht eindeutig BCR-destruktiv sind (Bräuninger et al., 2006; Jox et al., 1999). Zudem sind alle PTLD-Fälle mit BCR-verkrüppelnden Mutationen EBV-positiv (Bräuninger et al., 2003; Capello et al., 2003; Timms et al., 2003). In einer aktuellen Studie wurden auch in drei Fällen von EBV⁺ DLBCL in HIV-Patienten BCR-destruktive Mutationen in ursprünglich funktionellen V-Genomordnungen gefunden (Capello et al., 2008). Basierend auf diesen Erkenntnissen sowie auf den Ergebnissen dieser Arbeit und zwei gleichzeitigen Studien können Lymphom-Vorläuferzellen mit BCR-verkrüppelnden Mutationen nur dann überleben und zu einem malignen Tumor transformieren, wenn die Vorläuferzellen auch EBV-positiv sind (Bräuninger et al., 2006; Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005). Im Einklang mit diesen Erkenntnissen wird der „BCR-Ersatz“ LMP2A in EBV-positiven HL- und PTLD-Fällen sowie in den etablierten LCLs (Abb. 10) ausgeprägt (Küppers, 2003; Niedobitek et al., 1997b). Im HL sind jedoch die Signal-sendenden Kinasen und Adaptor-Moleküle des BCR-Signalweges weitestgehend herabreguliert, so dass ein typisches LMP2A-Signal im etablierten Tumorklon vermutlich nicht mehr stattfinden kann (Schwering et al., 2003). Die Rolle von EBV bezieht sich somit vorwiegend auf die frühe Pathogenese des HL, in der die B-Zellsignatur noch ausgeprägt wurde. Alternativ könnte LMP2A in etablierten EBV⁺ HRS-Zellen auch andere evtl. aberrant ausgeprägte Kinasen aktivieren und auf diesem Weg ein Signal senden. Eine Aktivierung von z.B. T-Zell-Rezeptor-Tyrosinkinasen durch LMP2A ist in der Tat beschrieben (Ingham et al., 2005).

Die Rettung prä-apoptotischer GC-B-Zellen durch LMP2A wird in den GC-LCLs sowie in der frühen HL-Pathogenese vermutlich durch die Ausprägung von LMP1

unterstützt. LMP1 sendet, ähnlich eines konstitutiv-aktivierten CD40R, wichtige Überlebenssignale und ist in EBV⁺ HL-Fällen vorraussichtlich an der charakteristischen NF- κ B-Überexpression beteiligt (Cahir McFarland et al., 1999; Gires et al., 1997; Kilger et al., 1998). Aktuelle Studien unserer Gruppe zeigten, dass die konstitutive NF- κ B-Ausprägung in EBV-negativen HL-Fällen, neben den Mutationen in den I κ B α - und I κ B ϵ -Genen und den c-rel-Amplifikationen, wahrscheinlich in den meisten Fällen durch Protein-inaktivierende Mutationen im NF- κ B-regulierenden Tumor-Suppressorgen A20 hervorgerufen wird (Cabannes et al., 1999; Emmerich et al., 1999; Emmerich et al., 2003; Jungnickel et al., 2000; Martin-Subero et al., 2002; Schmitz et al., Manuskript eingereicht). In einem Grossteil der analysierten Fälle sind beide A20 Allele inaktiviert. Im Gegensatz zu den EBV-negativen konnten in nur zwei von elf EBV-positiven HL-Fällen A20-Mutationen gefunden werden. In diesen Fällen handelt es sich jedoch lediglich um Aminosäure-Austausch-Mutationen (Schmitz et al., Manuskript eingereicht). A20-inaktivierende Mutationen in ausschliesslich EBV-negativen HL-Fällen scheinen die transformierende und NF- κ B-aktivierende Funktion von LMP1 in den EBV⁺ Fällen einzunehmen und unterstreichen somit die essentielle Rolle von EBV bei der Entstehung von EBV⁺ HL.

Es bleibt offen, welche transformierenden Ereignisse in den EBV⁻ HL-Fällen mit intakten A20, I κ B α und I κ B ϵ zu der konstitutiven NF- κ B-Aktivität geführt haben. Ein mögliches Kandidatengen, das inaktiviert zu einer verstärkten NF- κ B-Aktivierung führen kann, wäre evtl. Itch. Interessanterweise reguliert Itch den proteasomalen Abbau von Notch1 und ist für die NF- κ B-inhibierende Funktion von A20 essentiell (Qiu et al., 2000; Shembade et al., 2008). Es wird zudem diskutiert, dass im EBV⁺ HL bestimmte LMP1-Varianten für ein zusätzliches onkogenes Potential sorgen können (Knecht et al., 1993). Darüberhinaus könnte die LMP2A-Ausprägung die LMP1-verursachte, konstitutive Aktivierung von NF- κ B in HRS-Vorläuferzellen unterstützen (Guasparri et al., 2008; Swanson-Mungerson et al., 2005). Das LMP2A-Signal kann in der Maus über die Nedd4 Ubiquitin E3 Ligase Itchy negativ reguliert werden (Ikeda et al., 2003). Es wäre somit ebenfalls interessant zu sehen, ob evtl. in EBV⁺ HL-Fällen ein nicht-funktionelles Itch Protein, das humane Homolog von Itchy, an einer aberranten Verstärkung des LMP2A- und somit des NF- κ B-Signals beteiligt ist. Dies würde Einblicke in die bislang ungeklärte Frage liefern, warum EBV in gesunden Menschen als ein eher harmloses Virus in den B-Zellen persistiert, jedoch in einigen seltenen Fällen B-Zell-Lymphome auslösen kann. Ein starkes LMP2A-Signal kann zudem zu einer für das HL-typischen Inhibition der BCR-Ausprägung führen (Casola et al., 2004). Ein nicht-funktionelles Itch könnte somit die HL-typische aberrante Notch1-Ausprägung

unterstützen und in den EBV⁻ HL-Fällen mit intakten A20 und IκBα evtl. analog eines evtl. deregulierten LMP2A-Signals in den EBV⁺ Fällen zu der HL-charakteristischen NF-κB-Überexpression führen.

Die Rolle von EBV bei der Rettung prä-apoptotischer GC-B-Zellen vor der Apoptose wurde in der vorliegenden Arbeit durch die EBV-Transformation von prä-apoptotischen GC-B-Zellen aus humanen Tonsillen erfolgreich demonstriert. Eine essentielle Funktion bei der Rettung dieser Zellen vor der Apoptose spielen hierbei LMP2A und das NF-κB-aktivierende LMP1. Die Etablierung von BCR-verkrüppelten GC-LCLs deutet darauf hin, dass EBV auch in vivo für die Rettung und somit für die Transformation dieser prä-apoptotischen GC-B-Zellen verantwortlich sein kann und unterstreicht somit die wesentliche Funktion der EBV-Infektion in der frühen HL- und PTL-D-Pathogenese hin.

4.2 Einfluss von EBV auf GC- und naive B-Zellen

Die Interaktion von EBV mit GC-B-Zellen wird kontrovers diskutiert und es ist bislang ungeklärt, ob eine direkte Infektion von GC-B-Zellen innerhalb der viralen Persistenz-Entwicklung üblich ist oder eher eine Ausnahme darstellt. Die Analyse EBV-induzierter Veränderungen in der Genexpression von GC-B-Zellen nach Infektion in vitro liefert daher wichtige Hinweise auf die normale Interaktion von EBV mit GC-B-Zellen. Bisherige Analysen der EBV-induzierten Genexpressions-Veränderungen beschränkten sich auf Vergleiche von EBV⁻ und EBV⁺ BL-Zelllinien und LCLs oder auf den Einfluss von nur einzelnen EBV-kodierten Proteinen (Baran-Marszak et al., 2002; Carter et al., 2002; Portis et al., 2003; Schlee et al., 2004; Vockerodt et al., 2008; Zhao et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des vollständigen EBV auf normale GC-B-Zellen mit unterschiedlichen BCR-Zuständen untersucht. Um den speziellen Einfluss von EBV auf vorhandene Genexpressions-Muster verschiedener B-Zellpopulationen zu analysieren, wurden zudem naive B-Zellen mit EBV infiziert.

Die EBV-Transformation naiver B-Zellen in vitro in langlebige LCLs stellte sich als unerwartet schwierig heraus. Erste Versuche der Etablierung von N-LCLs führten zum Auswachsen von Zellklonen mit mutierten V-Genen und deuteten auf ein bevorzugtes Auswachsen seltener, die naive B-Zellkultur-kontaminierender Gedächtnis-B-Zellen hin. Nur unter sehr stringenten Isolierungs-Bedingungen in Form von mehreren konsekutiven MACS-Färbungen und MACS-Säulenläufen konnten naive B-Zellen isoliert und erstmalig monoklonale LCLs von konventionellen naiven B-Zellen mit unmutierten V-Genen etabliert werden. Die monoklonalen GC- und N-LCLs wurden auf die Ausprägung von B-Zell-Markern und speziell von B-Zell-Differenzierungsmarkern analysiert.

Es wird vermutet, dass EBV in vivo zuerst naive B-Zellen infiziert und dort eine Latenz III exprimiert. Latenz III-aktivierte B-Zellen differenzieren dann weiter in GC- und schliesslich in Gedächtnis-B-Zellen, in denen eine Latenz II bzw. eine Latenz 0 exprimiert würden. In den Gedächtnis-B-Zellen werden somit keine immunogenen EBV-Proteine mehr exprimiert (Thorley-Lawson, 2005). Hingegen haben Einzelzell-Analysen von IM-Tonsillen gezeigt, dass EBV-infizierte B-Zellen zwar, wie für GC-B-Zellen typisch, klonal expandieren, jedoch keine SHM in diesen Zellen mehr stattfindet (Kurth et al., 2000). EBV-infizierte B-Zellen in der IM nehmen somit nicht mehr an einer normalen GC-Reaktion teil. Zudem wurde gezeigt, dass in diesen EBV⁺ Zellen verschiedene Latenzprogramme von EBV, u.a. eine Latenz IV mit der Ausprägung von EBNA2 ohne LMP1, ausgeprägt werden können (Kurth et al., 2003).

In Einklang mit den Befunden in IM-Tonsillen weisen die Ergebnisse in den LCLs darauf hin, dass Latenz III-exprimierende EBV-infizierte B-Zellen vermutlich nicht mehr an den normalen Differenzierungsprozessen der B-Zellen teilnehmen können. In den monoklonalen LCLs werden vorhandene B-Zell-Differenzierungsprofile durch den Einfluss der latenten EBV-Proteine nahezu vollständig überschrieben und eine Unterscheidung von naiven und GC-B-Zelllinien anhand von phänotypischen Differenzierungsmustern ist kaum mehr möglich. Eine Ausnahme bildet hierbei evtl. die Aktivierung von GATA3 durch EBV in ausschliesslich GC-LCLs. Typische GC-B-Zellmarker wie AID, BCL-6 und CD77, die B-Zell-spezifischen TF EBF und PU.1 sowie die BCR-assoziierte Tyrosinkinase SYK wurden in nahezu allen GC-LCLs herabreguliert. In einer monoklonalen N-LCL wird die SYK-Ausprägung sogar vollständig inhibiert. In dieser N-LCL könnte evtl. das LMP2A-Signal einzig durch Lyn vermittelt werden (Rovedo und Longnecker, 2008). Ein SYK-unabhängiger, jedoch SRC-Kinasen und NF- κ B-abhängiger BCR-Signalweg wurde in der Tat bereits beschrieben (Saijo et al., 2003). Die Herabregulation von BCL-6 und CD38 in GC-LCLs geht vorraussichtlich auf die CD40-Signal-nachahmende Funktion von LMP1 zurück (Basso et al., 2004; Cattoretti et al., 1997). Kürzlich wurde gezeigt, dass die Ausprägung eines Fusionsproteins mit der Transmembrandomäne von LMP1 in Kombination mit der signal-sendenden Domäne des CD40R ausreicht, um in transgenen Mäusen die Formation von GC zu verhindern und B-Zell-Lymphome auszulösen (Hömig-Hölzel et al., 2008). Die fehlende Ausprägung von BCL-6, des Hauptregulators der GC-Reaktion, in N-LCLs in der Latenz III stellt somit eine Differenzierung von ebenfalls Latenz III-exprimierenden naiven B-Zellen in vivo in GC-B-Zellen, wie es während der Etablierung der EBV-Persistenz vermutet wird, in Frage (Thorley-Lawson, 2005).

Interessanterweise führt die EBV-Infektion von naiven B-Zellen zu einer schwachen Ausprägung des Gedächtnis-B-Zellmarkers CD27 und der GC B-Zellmarker CD77 und AID sowie zu einer Verstärkung der CD38-Ausprägung. Die Aktivierung von GC-B-Zellmarkern in naiven B-Zellen könnte analog eines kombinierten CD40- und BCR-Signals durch LMP1 und LMP2A induziert worden sein, wobei die Signalstärke des CD40R die Ausprägung von CD77 in naiven B-Zellen steuert (Galibert et al., 1996; McCloskey et al., 1999; Wheeler und Gordon, 1996). Die Expression von CD27 in Latenz III-exprimierenden N-LCLs deutet darauf hin, dass evtl. auch in vivo infizierte naive B-Zellen CD27 GC-unabhängig aktivieren können und somit phänotypisch Gedächtnis-B-Zellen ähneln. Die CD27-Ausprägung könnte in den N-LCLs durch das CD40-Signal-imitierende LMP1-Protein aktiviert werden (Fecteau und Neron, 2003). Es wurde gezeigt, dass CD27 über TRAF2 und TRAF5 zur Aktivierung von NF- κ B führen kann (Akiba et al., 1998). Ein aktiviertes CD27 könnte somit in den EBV-infizierten B-Zellen das Überleben der Zellen unterstützen.

Neben der Ausprägung von CD27 kann die Expression von LMP1 in vitro auch zu einem KW von IgM zu IgG, IgA oder IgE führen (He et al., 2003). In der Maus führt das LMP1-Signal hingegen zu einem bevorzugten KW nach IgG1 (Rastelli et al., 2008). Die Ausprägung von IgG1 könnte für EBV-infizierte B-Zellen ein Überlebensvorteil sein, da beschrieben ist, dass IgG1 exprimierende B-Zellen länger leben und vom Ig α -Signal unabhängiger sind (Waisman et al., 2007). Ein KW konnte in den hier etablierten monoklonalen N-LCLs nicht beobachtet werden. Dennoch zeigen der Befund dieser Arbeit, die Induktion der CD27-Ausprägung in naiven B-Zellen durch EBV, und die Studien von He et al. und Rastelli et al., dass die Verteilung EBV-infizierter Zellen in bestimmten B-Zellpopulationen im PB von gesunden Menschen nicht einzig anhand von Oberflächen-Markern bestimmt werden sollten. In der Tat wurden bisher B-Zellpopulationen aus dem PB gesunder Menschen zur Charakterisierung der viralen Persistenz der EBV⁺ Zellen durch Sortierungsstrategien mit typischen Oberflächen-Differenzierungsmarkern isoliert (Thorley-Lawson, 2005).

Die Analyse monoklonaler BCR⁺, BCR⁻ und BCR-verkrüppelter GC-LCLs sowie von N-LCLs hat gezeigt, dass EBV in der Lage ist, essentielle Profile von B-Zell-Differenzierungsstadien unabhängig vom BCR-Status zu überschreiben. Hierbei werden interessanterweise für die Zell-Differenzierung wesentliche TF wie BCL-6 und GATA3 ebenfalls von EBV dereguliert. Diese Fähigkeit von EBV zur phänotypischen Deregulation von B-Zellen ermöglicht vermutlich einerseits eine optimale Ausbreitung des Virus im Menschen, durch die Expression Proliferations-treibender viraler Proteine, und andererseits eine möglichst kurze Ausprägung immunogener latenter Genprodukte von EBV, durch die

Aktivierung von zellulären Proteinen, die vorraussichtlich die Latenz-Umschaltung in der viralen Genexpression fördern können.

4.3 GC-LCLs als In-Vitro-Modelle der HL- und PTLD-Pathogenese

Die Assoziation von BCR-verkrüppelten HRS- und PTLD-Zellen mit der EBV-Infektion in diesen Tumorklonen impliziert eine wesentliche Rolle des Virus bei der Entstehung dieser Lymphome. Auf diesem Hintergrund wurden in der vorliegenden Arbeit GC-B-Zellen mit EBV infiziert und auf HRS-Zell-typische Merkmale untersucht. Die EBV-Infektion führt unabhängig vom BCR-Status der Zellen zu einer Herabregulation von B-Zellmarkern, die an das Fehlen der B-Zellsignatur in HRS-Zellen erinnert (Schwering et al., 2003). Im Gegensatz zu PTLD-Zellen, die hauptsächlich wie die LCLs ein Latenz III-Profil von EBV zeigen, exprimieren HRS-Zellen eine Latenz II mit EBNA1, LMP1 und LMP2A (Deacon et al., 1993; Grässer et al., 1994; Herbst et al., 1991; Niedobitek et al., 1997b; Pallesen et al., 1991). Die hier etablierten GC-LCLs können trotz des Latenz-Unterschiedes zu HRS-Zellen wichtige In-Vitro-Modelle für die frühe HL-Pathogenese darstellen, da diese vermutlich durch eine EBV-Infektion von GC-B-Zellen initiiert wird, die zunächst eine Latenz III ausgeprägt haben (Alfieri et al., 1991). Tatsächlich gibt es Hinweise, dass HRS-Vorläuferzellen im GC mit EBV infiziert werden können (Tinguely et al., 2003).

Die Ähnlichkeit der GC-LCLs mit dem HL zeigt sich in der Ausprägung von CD30, der Herabregulation von BCL-6 und Ig β sowie in der aberranten Ausprägung des T-Zell-spezifischen TF GATA3 in GC-LCLs, jedoch nicht in N-LCLs. Die Aktivierung von GATA3 in GC-LCLs zeigt, dass EBV in der Lage ist die Regulation Zelltyp-entscheidender TF zu beeinflussen. In den Latenz III-exprimierenden GC-LCLs könnte die Aktivierung von GATA3 durch EBNA2 hervorgerufen werden, da EBNA2 die Funktion eines aktivierten Notch1-Rezeptor imitiert, und Notch1 GATA3 direkt aktivieren kann (Amsen et al., 2007; Fang et al., 2007; Strobl et al., 1997). Zudem kann die Ausprägung von LMP2A zur Aktivierung von CBF1, einem wichtigen Notch1- und EBNA2-Koaktivator führen (Portis und Longnecker, 2003). Darüberhinaus kann allein die Ausprägung von LMP2A bereits für die im HL-typische Herabregulation der hier analysierten wichtigen B-Zellmarker wie BCL-6, SYK, EBF und PU.1 verantwortlich sein (Portis et al., 2003; Portis und Longnecker, 2003; Schwering et al., 2003). LMP2A hat zudem eine essentielle Rolle bei der Rettung von BCR-negativen GC-B-Zellen vor der Apoptose und somit vorraussichtlich eine tragende Funktion im Transformationsprozess der HRS-Vorläuferzellen (siehe 4.1) (Chaganti et al., 2005; Mancao et al., 2005; Mancao und Hammerschmidt, 2007). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass die Transfektion von GC-B-Zellen mit LMP1 ebenfalls zu einer

Herabregulation von B-Zell-spezifischen Proteinen wie Ig β , SYK und BCL-6 führen kann (Vockerodt et al., 2008). In EBV⁺ HL-Fällen kann demnach die EBV-Infektion bereits zu einer Herabregulation B-Zell-spezifischer Differenzierungsmarker geführt haben. Im Gegensatz zum HL, wo eine fast vollständige Inhibition von B-Zellmarkern stattfindet (Schwering et al., 2003), werden jedoch in nahezu allen LCLs CD20, PU.1, EBF, Syk und die Differenzierungsfaktoren CD27 und CD38 noch exprimiert. EBV ist somit an der Herabregulation der B-Zellsignatur beteiligt, aber es werden vermutlich weitere transformierende Ereignisse benötigt, um den vollständigen Phänotyp einer HRS-Zelle zu etablieren.

PTLD umfasst eine heterogene Gruppe von GC-B-Zell-Lymphomen, die nach einer Transplantation in immunsupprimierten Patienten entstehen können. PTLDs in Patienten, die ein Organ transplantiert bekommen haben, entstehen meistens aus Transplantat-Empfänger-Zellen. PTLDs in Patienten nach einer Knochenmark-Transplantation entstehen hingegen hauptsächlich aus Donor-Zellen (Dolcetti, 2007). In beiden Fällen können proliferierende EBV⁺ B-Zellen durch die Immunsupprimierung vom Immunsystem nicht mehr kontrolliert werden. Zu der heterogenen Gruppe der PTLDs gehören BL/BL-ähnliche Lymphome, polymorphe PTLDs sowie zentroblastische und immunoblastische DLBCLs. Die meisten BL/BL-ähnlichen und zentroblastischen DLBCLs exprimieren BCL-6, tragen mutierte V-Gene und zeigen eine fortlaufende SHM im Tumorklon. Polymorphe und immunoblastische PTLDs tragen ebenfalls mutierte V-Gene in seltenen Fällen mit fortlaufender SHM, zeigen jedoch hingegen keine BCL-6-Ausprägung.

Die monoklonalen LCLs ähneln vermutlich eher den polymorphen und immunoblastischen PTLDs, da dort ebenfalls ein Latenz III-Profil von EBV exprimiert wird und die LCLs wie diese PTLD-Subtypen kein BCL-6 ausprägen (Brink et al., 1997; Capello et al., 2005). Eine weitere Ähnlichkeit der PTLDs mit den N- und GC-LCLs ist die Ausprägung des B-Zellmarkers CD20 sowie des B-Zell-Differenzierungsmarkers CD38 (Timms et al., 2003). Die Analyse EBV⁺ Zellen im PB von pädiatrischen Transplantations-Patienten, die einen erhöhten EBV-Spiegel aufweisen, hat gezeigt, dass ca. zwei Drittel der B-Zellen mit einer geringen EBV-Episom-Anzahl (im Bereich von <200 Episom-Kopien/10⁵ B-Zellen) IgM⁺ waren und wie die in der vorliegenden Arbeit etablierten N-LCLs keinen KW vollzogen hatten (Rose et al., 2001; Schauer et al., 2004). Die EBV⁺ Zellen dieser Patienten haben somit nicht notwendigerweise an einer GC-Reaktion teilgenommen. Darüberhinaus war die Mehrzahl der B-Zellen mit einer hohen EBV-Episom-Anzahl (≥ 200 Episom-Kopien/10⁵ B-Zellen), wie auch ca. 50% der hier etablierten GC-LCLs, Oberflächen-Ig-negativ (Rose et al., 2001; Schauer et al., 2004). Dies könnte

daraufhin deuten, dass entweder a) die Ausprägung des BCR-Ersatzes LMP2A diese evtl. BCR-verkrüppelnde Mutationen-tragenden Zellen vor der Apoptose schützt oder b) dass die EBV-Infektion dieser Zellen zur vollständigen Herabregulation der BCR-Ausprägung geführt hat. Eine Inhibition der IgH-Ausprägung durch EBNA2 und LMP2A sowie die Abhängigkeit EBV-infizierter B-Zellen von LMP2A statt vom BCR wurden in der Tat beschrieben (Jochner et al., 1996; Mancao und Hammerschmidt, 2007; Portis und Longnecker, 2003). Eine weitere Charakterisierung der BCR⁻ B-Zellen pädiatrischer EBV⁺ Transplantations-Patienten ergab, dass zudem eine Herabregulation von weiteren B-Zellmarkern stattgefunden hat (Schauer et al., 2008). EBV-infizierte B-Zellen in diesen Patienten ähneln somit stark den hier etablierten LCLs und scheinen in einem B-Zell-Signatur-unabhängigen, aberranten Zustand in der Peripherie zu überleben.

Die phänotypische Analyse monoklonaler GC-LCLs im Hinblick auf den Einfluss von EBV auf die Entstehung von HL und PTLD hat gezeigt, dass die EBV-Infektion unabhängig vom BCR-Status bereits zur Herabregulation typischer B-Zellmarker führt. Obwohl in EBV⁺ HRS-Zellen ein weitaus stärkerer Verlust der B-Zell-Identität stattgefunden hat, zeigt die Aktivierung Zelltyp-entscheidender TF wie GATA3 in GC-LCLs, dass EBV in der Lage ist essentielle zelluläre Regulationsmechanismen zu beeinflussen. Es bleibt jedoch offen, welche weiteren transformierenden Ereignisse zum vollständigen HRS-Zell-Phänotyp führen bzw. welche Ereignisse in den EBV⁻ HL-Fällen an dem Verlust der B-Zellsignatur der Tumorzellen beteiligt sind. Die Übereinstimmung der Latenz III-Ausprägung und die Ähnlichkeiten im Ausprägungsprofil von PTLD-Tumorzellen und EBV-infizierten B-Zellen in pädiatrischen Transplantations-Patienten mit den hier etablierten monoklonalen N- und GC-LCLs unterstreicht die Funktion dieser LCLs als wichtige In-Vitro-Modelle der Entstehung von PTLD (Brink et al., 1997; Schauer et al., 2008; Timms et al., 2003).

4.4 EBV Latenz III inhibiert die Aktivität der SHM in GC-B-Zellen

AID ist für die SHM und den KW der B-Zellen essentiell (Muramatsu et al., 2000). Die SHM und der KW stellen eine potentielle Gefahr für die genomischen Integrität der B-Zellen dar, da es während dieser Reaktionen zu Punktmutationen und Chromosenstrangbrüchen kommt. Nur durch ein zielgerichtetes AID und durch die richtige Balance zwischen Fehlerfreier- und Fehler-behafteter-DNA-Reparatur wird die genomische Integrität der Zellen erhalten (Liu et al., 2008). In normalen B-Zellen werden neben den Ig-Genen BCL-6, FAS, CD79A und CD79B in einem geringen Maße von der SHM erfasst und mutiert (Gordon et al., 2003; Müschen et al., 2000b; Pasqualucci et al., 1998; Shen et al.,

1998). Zudem wurden die Gene PIM1, PAX5, MYC und RHOH als aberrante Zielstrukturen der SHM in B-Zell-Lymphomen beschrieben (Pasqualucci et al., 2001). Eine aktuelle Studie hat gezeigt, dass eine fehlgerichtete AID-Aktivität sich in einem geringen Maße sogar weitläufig über das Genom erstrecken kann (Liu et al., 2008). Gerät die AID-Ausprägung, die posttranslationalen Kontrollmechanismen bzw. die Zielrichtung von AID und der DNA-Reparatur-Enzyme ausser Kontrolle, kann es zur Transformation der Zelle, wie z.B. bei der c-Myc-Translokation im BL, kommen (Dorsett et al., 2007; Greeve et al., 2003; Küppers und Dalla-Favera, 2001; Pasqualucci et al., 2008).

EBV-assoziierte Lymphome stammen vermutlich alle von GC-B-Zellen ab, die im Verlauf der Affinitätsreifung im GC Zell-transformierende Ereignisse erfahren haben (Küppers, 2003). Kürzlich wurde gezeigt, dass AID für die Lymphompathogenese essentiell ist, und dass AID-Expressionstärken das Ausmaß an C-Myc-Translokationen und der BL-Entstehung bestimmen (Pasqualucci et al., 2008; Takizawa et al., 2008). AID wird im BL und in seltenen Fällen des klassischen HL ausgeprägt (Greiner et al., 2005; Pasqualucci et al., 2004). Zudem zeigen ca. 30% der PTL-D-Fälle AID-Aktivität in Form einer ASH in den Tumorzellen (Cerri et al., 2004). Es ist bekannt, dass EBV eine genetische Instabilität der infizierten Zellen auslösen kann (Gualandi et al., 2001). Darüberhinaus hat EBV durch die Ausprägung des CD40-Signal-imitierenden LMP1 das Potential, die Aktivität von AID zu induzieren (He et al., 2003). Eine mögliche aberrante Aktivierung der AID-Ausprägung und somit der SHM im GC durch eine EBV-Infektion steht aus diesen Gründen in Verdacht die maligne Transformation dieser GC-B-Zell-Lymphome zu fördern. Tatsächlich wird die Induktion von AID und der SHM durch EBV kontrovers diskutiert. Es wurde einerseits gezeigt, dass EBV die Ausprägung von AID und der Fehler-behafteten DNA-Polymerase Pol- η induzieren kann, und dass EBV-infizierte B-Zellen in vitro Mutationen in BCL-6 und p53 anhäufen können (Epeldegui et al., 2007; He et al., 2003). Zudem wurde in einer Rheumafaktor-produzierenden LCL gezeigt, dass EBV die SHM der V_H-Gene aktivieren kann (Gil et al., 2007). Andererseits führt die EBV-Infektion von BL Zelllinien zu keiner Veränderung der SHM-Aktivität (Harris et al., 2001). Eine weitere Studie weist daraufhin, dass die EBV-Infektion in vitro eher zu einer AID-Herabregulation führt (Tobollik et al., 2006). AID wird demnach zwar durch LMP1 aktiviert, jedoch durch EBNA2 negativ reguliert, und es wird vermutet, dass in LCLs über einen längeren Zeitraum EBNA2 bei der Regulation von AID über LMP1 dominant ist (He et al., 2003; Tobollik et al., 2006).

Alle hier analysierten monoklonalen LCLs, inklusive der N-LCLs, waren in verschiedenen Stärken AID-positiv, zeigten jedoch alle im Vergleich zu GC-B-Zellen eine eher schwache AID-Ausprägung (Abb. 16). Diese moderate AID-Ausprägung in den LCLs

könnte u.a. durch eine AP-1-abhängige Induktion der miR-155 vermittelt werden, da kürzlich gezeigt wurde, dass diese miR durch EBV induziert wird, und dass die Ausprägung von AID durch die miR-155 negativ reguliert wird (Dorsett et al., 2008; Teng et al., 2008; Yin et al., 2008). Interessanterweise werden AP-1 sowie auch die miR-155 im klassischen HL, das nur selten AID-positiv ist und keine fortlaufende SHM im Tumorklon zeigt, stark ausgeprägt (Greiner et al., 2005; Kluiver et al., 2005; Mathas et al., 2002). Die phänotypische Analyse der drei N-LCLs hat ergeben, dass eine AID-Induktion durch EBV zwar stattfinden kann, jedoch nicht notwendigerweise zum KW der infizierten Zellen führt.

Durch die SHM tragen Mitglieder eines Zellklons die gleiche V-Genumlagerung, unterscheiden sich jedoch im Muster der neu eingeführten Mutationen. Obwohl GC-B-Zellen *in vivo* eine starke V-Gen-Diversifikation zeigen, konnten in 20 von 24 monoklonalen GC-LCLs keine signifikanten intraklonalen Mutations-Unterschiede festgestellt werden (Tabelle 8). In diesen GC-LCLs hat die EBV-Infektion somit zu einer Stilllegung der SHM-Aktivität geführt, obwohl die Ig-Loci, wie in der quantitativen RT-PCR gezeigt wurde, transkribiert werden und somit AID-zugänglich wären, und obwohl AID in den Linien exprimiert wird. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde in DLBCLs, MALT-Lymphomen, Immunozytomen und CLLs gezeigt, dass die AID-Ausprägung nicht unbedingt mit einer fortlaufenden SHM-Aktivität korreliert (Greeve et al., 2003; Pasqualucci et al., 2004). Nur vier der GC-LCLs zeigen eine sehr schwache SHM. Zwei dieser schwach-mutierenden GC-LCLs wurden auch auf die Ausprägung von AID analysiert und gehören zu den GC-LCLs, die eine stärkere AID-Ausprägung aufweisen. Das Ausmaß der AID-Expression könnte daher, wie in einer aktuellen Studie für IgH-cMYC-Translokationen beschrieben, für die AID-Aktivität in diesen GC-LCLs ausschlaggebend sein (Takizawa et al., 2008).

AID befindet sich normalerweise hauptsächlich cytoplasmatisch und es wird vermutet, dass AID erst durch die Phosphorylierung durch die Protein Kinase A in den Zellkern wandert (Basu et al., 2005; Cattoretti et al., 2006; Chaudhuri et al., 2004; Pasqualucci et al., 2004). Aktuelle Arbeiten zeigen zudem, dass Ubiquitinierungsprozesse sowie AID-Splicevarianten die Menge an nukleären AID bzw. die AID-Aktivität kontrollieren (Aoufouchi et al., 2008; Wu et al., 2008). Die Stilllegung der AID-Aktivität in den GC-LCLs könnte daher einerseits auf einer transkriptionellen und andererseits auf einer post-transkriptionellen AID-Inhibition beruhen. Überraschenderweise zeigte eine von drei monoklonalen N-LCLs, die bei der direkten Sequenzierung der N-LCL DNA unmutiert war, ebenfalls eine intraklonale Diversität. EBV kann demnach nicht nur die GC-Marker CD77 und AID in N-LCLs induzieren, sondern auch ähnlich wie eine BCR-Kreuzvernetzung und

Ko-Kultur mit aktivierten TH2 T-Zellen die komplexen Mechanismen der SHM in einigen naiven B-Zellen aktivieren (Razanajaona et al., 1997). Im Einklang mit der Herabregulation der AID-Ausprägung durch EBNA2 zeigte die leicht-mutierende N-LCL B1-18 die schwächste EBNA2-Ausprägung (Abb. 14) (Tobollik et al., 2006).

Die hier durchgeführte Analyse einer Vielzahl von monoklonalen GC-LCLs und N-LCLs auf eine fortlaufende SHM in der Zellkultur hat erwiesen, dass EBV-infizierte B-Zellen in der Latenz III nur selten SHM-Aktivität zeigen. In den meisten Fällen wird zwar AID exprimiert, bleibt jedoch im Hinblick auf die SHM inaktiv. EBV ist demnach an einer Induktion der SHM in GC-B-Zellen eher unbeteiligt. Übereinstimmend mit den hier vorliegenden Ergebnissen konnte eine Korrelation der ASH in PTLD-Fällen mit der EBV-Infektion in diesen Tumorzellen nicht gefunden werden (Cerri et al., 2004). Kürzlich wurde gezeigt, dass ein starkes BCR-Signal, ausgelöst durch eine hochaffine Bindung an das Antigen, die AID-Ausprägung inhibieren kann und somit den Austritt der B-Zellen aus dem GC fördert (Hauser et al., 2008). Die Herabregulation von AID durch EBNA2 sowie die Stilllegung der SHM in den meisten GC-LCLs könnte analog dieser Studie durch ein konstitutives BCR-Signal, wie es von LMP2A gesendet wird, unterstützt werden (Tobollik et al., 2006). Im Einklang mit diesen Ergebnissen zur Rolle von EBV bei der SHM fördert die Inhibition der BCL-6-Ausprägung in Latenz III-exprimierenden naiven und GC-B-Zellen eher den Austritt als den Eintritt EBV-infizierter B-Zellen in das GC. Eine Beteiligung von EBV bei der Aktivierung der SHM und damit verbunden evtl. der ASH in Lymphom-Vorläuferzellen spielt, aufgrund der vorliegenden Ergebnisse, in Latenz III-exprimierenden Zellen vermutlich keine Rolle bei der Zell-Transformation.

4.5 Vorstellung einer verlässlichen Methode zur Aufreinigung seltener EBV⁺ B-Zellen aus dem PB

EBV infiziert ungefähr 90% der Menschen weltweit und persistiert als harmloses Virus in den B-Zellen der Virus-Träger (Küppers, 2003). Obwohl EBV bereits 1964 in BL-Biopsien gefunden und als erstes humanes Tumovirus identifiziert wurde (Epstein et al., 1965), ist die Etablierung der viralen Persistenz im Menschen bislang immer noch weitestgehend ungeklärt. Ebenfalls ungeklärt ist die Frage, warum EBV in der überwiegenden Mehrheit der Menschen ein harmloses Virus darstellt, jedoch in einigen seltenen Fällen B-Zell-Lymphome auslösen kann. Es wird einerseits angenommen, dass EBV zur Etablierung der viralen Persistenz die normalen Stadien der B-Zell-Differenzierung ausnutzt, während der GC-Reaktion immunogene latente Genprodukte abschaltet, um sich lebenslang in Gedächtnis-B-Zellen vor einer effizienten T-Zell-Immunantwort zu verstecken (Thorley-

Lawson, 2005). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, dass Transkripte latenter EBV-Genprodukte in gesunden Menschen ausschliesslich in der IgD-negativen B-Zellfraktion des PB zu finden ist (Babcock et al., 1998), und dass in tonsillären naiven B-Zellen eine Latenz III, in GC-B-Zellen jedoch eine Latenz II des Virus exprimiert wird (Babcock et al., 2000; Joseph et al., 2000). Aktuelle Studien dieser Gruppe deuten darauf hin, dass EBV-infizierte B-Zellen eine höhere Frequenz an V-Genmutationen besitzen und im GC stark selektiert wurden (Souza et al., 2005; Souza et al., 2007). Dies lässt vermuten, dass EBV⁺ B-Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Gedächtnis-B-Zellen verstärkt an der GC-Reaktion teilgenommen haben und impliziert eine evtl. Antigen-Abhängigkeit in der Persistenz-Entwicklung.

Im Gegensatz zu diesen Studien befindet sich EBV in IM-Tonsillen zwar in B-Zellen mit mutierten V-Genumordnungen, jedoch tragen die expandierten EBV-Klone keine intraklonalen Mutationen und haben somit die SHM deaktiviert (Kurth et al., 2000). EBV⁺ B-Zellen in der IM scheinen demnach nicht mehr an dem Differenzierungsstadium der GC-Reaktion teilzunehmen bzw. dieses Stadium zur Persistenz-Etablierung nicht zu benötigen. Desweiteren werden EBV-infizierte B-Zellen nur äusserst selten bei histologischen Untersuchungen von Tonsillen innerhalb von GC gefunden (Araujo et al., 1999; Hudnall et al., 2005; Niedobitek et al., 1992). Der Prozentsatz liegt bei Brasilianischen Tonsillen höher als bei Tonsillen in westlichen Ländern (Araujo et al., 1999). Die Infektion von tonsillären und PB-B-Zellen mit EBV in vitro hat zudem gezeigt, dass B-Zellen unterschiedlicher Ig-Isotypen, mit der Ausnahme von IgD⁺ B-Zellen, für die EBV-Transformation eine ähnliche Empfänglichkeit aufwiesen (Ehlin-Henriksson et al., 2003). Das Fehlen EBV-infizierter IgD⁺ B-Zellen in dieser Analyse könnte auf die beschriebene Herabregulation von IgD nach der BCR-Aktivierung zurückzuführen sein (Monroe et al., 1983). Eine aktuelle Studie hingegen zeigt eine ähnliche Empfänglichkeit für die EBV-Transformation von tonsillären naiven und Gedächtnis-B-Zellen, jedoch unterschiedliche Empfänglichkeiten dieser B-Zellpopulationen im PB (Dorner et al., 2008). Im Einklang mit den Studien von Kurth et al. weist diese Analyse darauf hin, dass tonsilläre Gedächtnis-B-Zellen direkte Zielzellen von EBV bei der Etablierung der viralen Persistenz darstellen (Dorner et al., 2008; Kurth et al., 2003; Kurth et al., 2000). Direkte Analysen der EBV-infizierten B-Zellen im PB von gesunden Virus-Trägern, die zur Aufklärung der kontrovers-diskutierten viralen Persistenz-Entwicklung führen könnten, wurden jedoch durch die Seltenheit der Zellen von 1-10 in 10⁶ B-Zellen bislang verhindert.

Die in dieser Arbeit etablierte Methode zur Aufreinigung und Analyse dieser seltenen EBV-infizierten Zellen aus dem PB von gesunden Blutspendern trägt zur

Aufklärung der viralen Verbreitungsstrategien und der Persistenz-Entwicklung im Menschen bei. EBV⁺ B-Zellen in der Latenz konnten mit dieser Methode über einen CD19-B-Zell-MACS, einer Fixierung der CD19⁺ Zellen mit anschließender EBER-ISH in Suspension, AP-Immunfärbung auf Membran-Objektträgern und Laser-Einzelzell-Mikromanipulation erstmalig isoliert und mit einer Zwei-Runden-EBNA1/V-Gen-PCR analysiert werden. Die Kontrolle der EBV-Infektion der isolierten B-Zellen durch die parallele Amplifikation von EBNA1, die Kontrollen mittels Isolierung von Membran-Fragmenten ohne Zellen sowie die Isolierung von EBV⁺ B-Zellen eines LCL- und EBV⁻ BL-Zellgemisches sichern die Spezifität und die hohe Verlässlichkeit der Isolierungs-Methode. Die Optimierung der Methode durch die Laser-Mikromanipulation der EBER⁺ Zellen ging zwar mit einer leichten Verringerung in der EBNA1-PCR-Effizienz einher, wird jedoch durch eine Verdoppelung der V-Gen-PCR-Effizienz bei Spender C kompensiert. Mit Hilfe dieser Aufreinigungs-Methode können erstmals detaillierte Informationen über bisher nur unzureichend beschriebene seltene EBV⁺ Zellpopulationen geliefert werden.

Die direkte Analyse erster EBV⁺ Einzelzellen von drei Spendern ergab Hinweise darauf, dass EBV in mutierten wie in unmutierten B-Zellen persistieren kann. Das Auffinden von EBV in unmutierten B-Zellen in der Persistenz in nahezu 25% der analysierten Zellen deutet darauf hin, dass EBV entgegen verbreiteter Annahmen evtl. auch GC-unabhängig das Stadium der viralen Persistenz erreichen kann (Thorley-Lawson, 2005). Es können zwar unmutierte Gedächtnis-B-Zellen im PB gefunden werden, jedoch sind diese eher selten und hauptsächlich in der IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B-Zellpopulation zu finden, die als EBV-negativ beschrieben ist (Babcock et al., 1998). Desweiteren wurden in Spender B zwei Zellklone mit jeweils vier Mitgliedern, jedoch jeweils ohne intraklonale Diversität, gefunden. Dies könnte einerseits ein ausschliesslich individueller Befund eines einzelnen Blutspenders sein. Andererseits könnte dies auch darauf hindeuten, dass das Reservoir von EBV oligoklonal ist, und EBV-infizierte B-Zellen nur äusserst selten das Stadium der viralen Persistenz erreichen bzw. es sich um sehr langlebige Zellen handelt. Interessanterweise wurde in Spender C eine EBV⁺ Zelle mit einer BCR-verkrüppelnden Mutation in einer ursprünglich intakten V_H-Genumlagerung gefunden. Das zweite IgH-Allel dieser Zelle konnte jedoch nicht detektiert werden und es bleibt unklar, ob es sich bei dieser Zelle um eine BCR-defiziente B-Zelle gehandelt hat, oder ob eine weitere funktionelle V_H-Genumlagerungen auf dem zweiten Allel zur Ausprägung eines BCR geführt hat. Seltene B-Zellen mit zwei funktionellen V_H-Genumlagerungen wurden bereits beschrieben (Rassenti und Kipps, 1997). Eine ältere Studie EBV-infizierter B-Zellen aus dem PB einer IM-Patientin sowie die Analysen EBV⁺ B-Zellen pädiatrischer Transplantations-Patienten weisen jedoch bereits daraufhin, dass die

Zerstörung von B-Zellen mit nicht-funktionellen BCR im GC während der viralen Infektion ineffizient verlaufen kann (Chapman et al., 1995b; Schauer et al., 2004; Schauer et al., 2008). Andere Studien haben gezeigt, dass im PB von IM- und immunsupprimierten Patienten EBV hingegen nur in mutierten und Antigen-selektierten Gedächtnis-B-Zellen gefunden werden konnte (Babcock et al., 1999; Souza et al., 2005; Souza et al., 2007). In IM-Patienten ist im Gegensatz zu gesunden Virus-Trägern bis zu jede zweite Gedächtnis-B-Zelle mit EBV infiziert, und es wurde gezeigt, dass EBV in IM-Tonsillen zur Expansion der infizierten Gedächtnis- und GC-B-Zellen führt (Hochberg et al., 2004b; Kurth et al., 2000). Das Auffinden vorwiegend EBV-infizierter Gedächtnis-B-Zellen im PB von IM-Patienten spiegelt somit nicht die normale EBV-Persistenz in gesunden Virus-Trägern wider. In den o.g. Arbeiten findet sich zudem leider kein Hinweis über mögliche klonale Verwandtschaften der EBV-infizierten PB-B-Zellen in der IM.

4.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit etablierten monoklonalen GC-LCLs stellen wichtige In-Vitro-Modelle zur Charakterisierung der frühen Hodgkin- und PTLD-Pathogenese dar. Die Herabregulation von B-Zellmarkern in den GC-LCLs erinnert an den Verlust der B-Zell-Signatur im HL. Im Vergleich zu PTLD ähneln die GC-LCLs den Tumorzellen vor allem in der Ausprägung der viralen Latenz III und zeigen Ähnlichkeiten mit EBV-infizierten B-Zellen in pädiatrischen Transplantations-Patienten. Eine Untersuchung der differentiellen Genexpression durch Genchip-Analysen von GC-LCLs im Vergleich zu primären EBV⁺ HL- und PTLD-Fällen sowie im Vergleich zu normalen GC-B-Zellen könnte weitere Details über den Einfluss von EBV bei der malignen Transformation von GC-B-Zellen liefern. Der Vergleich der GC-LCLs mit noch zu etablierenden PTLD-Linien ist hierbei von grossem Interesse, da in PTLD wie in den GC-LCLs eine Latenz III ausgeprägt wird und Unterschiede in der Genausprägung somit direkt deregulierte Signalwege des PTLD-Tumors enthüllen und auf maligne Transformations-Ereignisse in der PTLD-Entstehung hindeuten könnten. Die Funktion mittels Genchip identifizierter deregulierter Gene in der Entstehung bzw. Erhaltung des Lymphoms könnten durch funktionelle Studien in PTLD-Linien näher charakterisiert werden. Hierbei könnten aberrant hochregulierte Gene durch RNA-Interferenz wieder herabreguliert oder aberrant abgeschaltete Gene durch Transduktion dieser Gene wieder reexprimiert werden.

Für ein umfassendes Bild der EBV-Persistenz in gesunden Virus-Trägern ist die Analyse einer grösseren Anzahl EBV⁺ B-Zellen von Spender C sowie von weiteren Spendern essentiell. Bestätigen sich die ersten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, so wäre dies

einerseits ein starker Hinweis auf eine GC-unabhängige Persistenz-Entwicklung von EBV, dadurch dass auch unmutierte B-Zellen zum latenten EBV-Reservoir gehören. Andererseits weisen klonal verwandte B-Zellen ohne intraklonale Mutations-Unterschiede, wie sie auch in IM-Tonsillen gefunden werden, entweder auf eine direkte Infektion von GC-B-Zellen hin, die nach der EBV-Infektion die SHM eingestellt haben jedoch noch proliferieren, oder auf eine direkte Infektion von Gedächtnis-B-Zellen, die nach der Infektion klonal expandiert sind (Kurth et al., 2000). Zudem würde das Auffinden BCR-verkrüppelter EBV⁺ B-Zellen im PB gesunder Virus-Träger die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Rettung BCR-loser GC-B-Zellen durch EBV in vivo validieren und die essentielle Rolle des Virus in der Transformation BCR-verkrüppelter HRS- und PTLT-Tumorzellen abermals hervorheben.

In PB von pädiatrischen Transplantations-Patienten mit erhöhtem EBV-Spiegel wurden verstärkt BCR-negative B-Zellen, begleitet von einer Herabregulation weiterer B-Zellmarker, aufgefunden (Schauer et al., 2004; Schauer et al., 2008). Im Gegensatz hierzu zeigt eine andere Studie, dass in Symptom-freien Transplantations-Patienten mit erhöhtem EBV-Spiegel latent-EBV⁺ B-Zellen BCR-positiv sind und phänotypisch normalen Gedächtnis-B-Zellen ähneln (Babcock et al., 1999). Mit Hilfe der hier etablierten Methode wäre es möglich, Einzelzell-Analysen von frühen Proliferationen EBV⁺ Zellen in diesen Transplantations-Patienten durchzuführen, um die Diskrepanzen der o.g. Studien aufzuklären, und um detaillierte Einblicke in eine frühe, noch nicht maligne PTLT-Entstehung zu erlangen. Darüberhinaus hat eine aktuelle Studie gezeigt, dass EBV in XLP-Patienten (engl. X-linked lymphoproliferative disease), die durch einen Defekt in der Zytokin-Produktion der TH2-ähnlichen CD4⁺ T-Zellen keine konventionellen GC ausbilden können, in IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B-Zellen persistieren kann (Chaganti et al., 2008). Im Einklang mit dieser Studie kann EBV in Hyper-IgM-Patienten ebenfalls eine transiente Persistenz in nicht-Klassen-gewechselten IgM⁺ IgD⁺ CD27⁺ B-Zellen ausbilden (Conacher et al., 2005). Die Charakterisierung dieser seltenen latent EBV⁺ B-Zellen in Hyper-IgM-Patienten mit der hier vorgestellten Methode wäre zur weiteren Aufklärung der EBV-Persistenz-Entwicklung von grosser Bedeutung. Zudem könnte die Analyse der Mutationsmuster und der klonalen Zusammensetzung der latent EBV-infizierten B-Zellen in XLP-Patienten mit Hilfe dieser Methode einen Einblick in das komplexe Krankheitsbild dieser Immunschwäche liefern und Hinweise auf die Frage geben, warum die Primärinfektion mit EBV in vielen Patienten fatale Folgen hat.

5. Zusammenfassung

Die B-Zell-Rezeptor (BCR)-verkrüppelten Lymphom-Fälle des klassischen Hodgkin Lymphoms (HL) und der Post-Transplantations-Lymphome (PTLD) sind erstaunlicherweise alle Epstein-Barr Virus (EBV)-positiv. In der vorliegenden Arbeit wurde erstmals gezeigt, dass die Infektion mit EBV humane BCR-defiziente Keimzentra (GC)-B-Zellen vor der Apoptose retten und in langlebige lymphoblastoide Zelllinien (LCLs) transformieren kann. Dieser Befund verdeutlicht die essentielle Funktion des Virus in der Transformation BCR-verkrüppelter HL- und PTLD-Vorläuferzellen.

Die phänotypische Analyse der hier etablierten monoklonalen BCR⁺, BCR⁻ und BCR-verkrüppelten GC-LCLs und BCR⁺ LCLs von naiven B-Zellen (N-LCLs) auf B-Zell- und HL-typische Marker hat gezeigt, dass EBV in der Lage ist, wesentliche Profile von B-Zell-Differenzierungsstadien unabhängig vom BCR-Status zu überschreiben. Hierbei werden für die Zell-Differenzierung essentielle Transkriptionsfaktoren wie der GC-B-Zellmarker BCL-6 und der T-Zellmarker GATA3 von EBV dereguliert und es findet eine für das HL-charakteristische teilweise Herabregulation von B-Zellmarkern, wie z.B. EBF, PU.1, SYK und CD79b, statt. Die für das HL-typische aberrante Ausprägung von GATA3 und die Herabregulation der B-Zellsignatur in den GC-LCLs sowie die Übereinstimmung der Latenz III-Ausprägung der GC-LCLs mit PTLD-Tumorzellen demonstriert die Funktion der Zelllinien als wichtige In-Vitro-Modelle der frühen HL- und PTLD-Entstehung. Zudem wurde hier erstmals in einer grossen Anzahl monoklonaler GC-LCLs gezeigt, dass die EBV-Infektion meistens zu einer Stilllegung der somatischen Hypermutation (SHM) der GC-B-Zellen führt. EBV spielt, in Latenz III-exprimierenden Zellen, somit keine Rolle bei der Induktion der SHM und dem damit verbundenen Verlust der genomischen Integrität von Lymphom-Vorläuferzellen. Die Hauptrolle von EBV bei der Transformation von GC-B-Zellen liegt stattdessen in der aberranten Aktivierung einer Vielzahl von Signalwegen und in der Deregulation normaler B-Zell-Differenzierungsstadien.

In dieser Arbeit wurde eine Methode zur Aufreinigung und direkten Analyse einzelner EBV⁺ B-Zellen aus dem PB gesunder Virus-Träger etabliert. Diese Methode dient der Aufklärung der viralen Verbreitungsstrategien und der Persistenz-Entwicklung im gesunden Menschen. Zudem können andere seltene EBV⁺ Populationen, wie sie z.B. in Patienten nach einer Transplantation, in XLP-Patienten oder Hyper-IgM-Patienten vorkommen, mit dieser Methode charakterisiert werden. Vorläufige Ergebnisse latent EBV-infizierter B-Zellen von gesunden Blutspendern deuten darauf hin, dass die Etablierung der EBV-Persistenz auch GC-unabhängig erfolgen kann. EBV-infizierte GC-B-Zellen stellen somit nicht unbedingt ein natürliches Stadium auf dem Weg zur viralen Persistenz dar.

Teilpublikationen

Bechtel D., Kurth J., Unkel C., Küppers R., 2005. Transformation of BCR-deficient germinal-center B cells by EBV supports a major role of the virus in the pathogenesis of Hodgkin and posttransplantation lymphomas. Blood 106, 4345-4350.

Bräuninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renne C., Hansmann M.L., Küppers R. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. Int J Cancer 118 (8), 1853-61. Review.

Siemer D., Kurth J., Lang S., Lehnerdt G., Stanelle J., Küppers R., 2008. EBV transformation overrides gene expression patterns of B cell differentiation stages. Mol. Immunol. 45, 3133-3141.

6. Literaturverzeichnis

- Aiyar A., Tyree C. and Sugden B. 1998. The plasmid replicon of EBV consists of multiple cis-acting elements that facilitate DNA synthesis by the cell and a viral maintenance element. *Embo J* 17, 6394-6403.
- Akiba H., Nakano H., Nishinaka S., Shindo M., Kobata T., Atsuta M., Morimoto C., Ware C. F., Malinin N. L., Wallach D., Yagita H. and Okumura K. 1998. CD27, a member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, activates NF-kappaB and stress-activated protein kinase/c-Jun N-terminal kinase via TRAF2, TRAF5, and NF-kappaB-inducing kinase. *J Biol Chem* 273, 13353-13358.
- Alfieri C., Birkenbach M. and Kieff E. 1991. Early events in Epstein-Barr virus infection of human B lymphocytes. *Virology* 181, 595-608.
- Allen C. D., Okada T., Tang H. L. and Cyster J. G. 2007. Imaging of germinal center selection events during affinity maturation. *Science* 315, 528-531.
- Allman D., Jain A., Dent A., Maile R. R., Selvaggi T., Kehry M. R. and Staudt L. M. 1996. BCL-6 expression during B-cell activation. *Blood* 87, 5257-5268.
- Alt F. W., Rathbun G., Oltz E., Taccioli G. and Shinkai Y. 1992. Function and control of recombination-activating gene activity. *Ann N Y Acad Sci* 651, 277-294.
- Altmann M., Pich D., Ruiss R., Wang J., Sugden B. and Hammerschmidt W. 2006. Transcriptional activation by EBV nuclear antigen 1 is essential for the expression of EBV's transforming genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14188-14193.
- Aman M. J. and Ravichandran K. S. 2000. A requirement for lipid rafts in B cell receptor induced Ca(2+) flux. *Curr Biol* 10, 393-396.
- Amsen D., Antov A., Jankovic D., Sher A., Radtke F., Souabni A., Busslinger M., McCright B., Gridley T. and Flavell R. A. 2007. Direct regulation of Gata3 expression determines the T helper differentiation potential of Notch. *Immunity* 27, 89-99.
- Aoufouchi S., Faili A., Zober C., D'Orlando O., Weller S., Weill J. C. and Reynaud C. A. 2008. Proteasomal degradation restricts the nuclear lifespan of AID. *J Exp Med* 205, 1357-1368.
- ar-Rushdi A., Nishikura K., Erikson J., Watt R., Rovera G. and Croce C. M. 1983. Differential expression of the translocated and the untranslocated c-myc oncogene in Burkitt lymphoma. *Science* 222, 390-393.
- Araujo I., Foss H. D., Hummel M., Anagnostopoulos I., Barbosa H. S., Bittencourt A. and Stein H. 1999. Frequent expansion of Epstein-Barr virus (EBV) infected cells in germinal centres of tonsils from an area with a high incidence of EBV-associated lymphoma. *J Pathol* 187, 326-330.
- Arpin C., Dechanet J., Van Kooten C., Merville P., Grouard G., Briere F., Banchereau J. and Liu Y. J. 1995. Generation of memory B cells and plasma cells in vitro. *Science* 268, 720-722.
- Arrand J. R. and Rymo L. 1982. Characterization of the major Epstein-Barr virus-specific RNA in Burkitt lymphoma-derived cells. *J Virol* 41, 376-389.
- Babcock G. J., Decker L. L., Freeman R. B. and Thorley-Lawson D. A. 1999. Epstein-barr virus-infected resting memory B cells, not proliferating lymphoblasts, accumulate in the peripheral blood of immunosuppressed patients. *J Exp Med* 190, 567-576.
- Babcock G. J., Decker L. L., Volk M. and Thorley-Lawson D. A. 1998. EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* 9, 395-404.
- Babcock G. J., Hochberg D. and Thorley-Lawson A. D. 2000. The expression pattern of Epstein-Barr virus latent genes in vivo is dependent upon the differentiation stage of the infected B cell. *Immunity* 13, 497-506.

- Baran-Marszak F., Fagard R., Girard B., Camilleri-Broet S., Zeng F., Lenoir G. M., Raphael M. and Feuillard J. 2002. Gene array identification of Epstein Barr virus-regulated cellular genes in EBV-converted Burkitt lymphoma cell lines. *Lab Invest* 82, 1463-1479.
- Bargou R. C., Emmerich F., Krappmann D., Bommert K., Mapara M. Y., Arnold W., Royer H. D., Grinstein E., Greiner A., Scheidereit C. and Dorken B. 1997. Constitutive nuclear factor-kappaB-RelA activation is required for proliferation and survival of Hodgkin's disease tumor cells. *J Clin Invest* 100, 2961-2969.
- Basso K., Klein U., Niu H., Stolovitzky G. A., Tu Y., Califano A., Cattoretti G. and Dalla-Favera R. 2004. Tracking CD40 signaling during germinal center development. *Blood* 104, 4088-4096.
- Basu U., Chaudhuri J., Alpert C., Dutt S., Ranganath S., Li G., Schrum J. P., Manis J. P. and Alt F. W. 2005. The AID antibody diversification enzyme is regulated by protein kinase A phosphorylation. *Nature* 438, 508-511.
- Beaufils P., Choquet D., Mamoun R. Z. and Malissen B. 1993. The (YXXL/I)₂ signalling motif found in the cytoplasmic segments of the bovine leukaemia virus envelope protein and Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A can elicit early and late lymphocyte activation events. *Embo J* 12, 5105-5112.
- Beckmann J., Scheitza S., Wernet P., Fischer J. C. and Giebel B. 2007. Asymmetric cell division within the human hematopoietic stem and progenitor cell compartment: identification of asymmetrically segregating proteins. *Blood* 109, 5494-5501.
- Bell A. I., Groves K., Kelly G. L., Croom-Carter D., Hui E., Chan A. T. and Rickinson A. B. 2006. Analysis of Epstein-Barr virus latent gene expression in endemic Burkitt's lymphoma and nasopharyngeal carcinoma tumour cells by using quantitative real-time PCR assays. *J Gen Virol* 87, 2885-2890.
- Berek C., Berger A. and Apel M. 1991. Maturation of the immune response in germinal centers. *Cell* 67, 1121-1129.
- Blackwell T. K. and Alt F. W. 1984. Site-specific recombination between immunoglobulin D and JH segments that were introduced into the genome of a murine pre-B cell line. *Cell* 37, 105-112.
- Boccellato F., Anastasiadou E., Rosato P., Kempkes B., Frati L., Faggioni A. and Trivedi P. 2007. EBNA2 interferes with the germinal center phenotype by downregulating BCL6 and TCL1 in non-Hodgkin's lymphoma cells. *J Virol* 81, 2274-2282.
- Bornkamm G. W. and Hammerschmidt W. 2001. Molecular virology of Epstein-Barr virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356, 437-459.
- Bornkamm G. W., Hudewentz J., Freese U. K. and Zimmer U. 1982. Deletion of the nontransforming Epstein-Barr virus strain P3HR-1 causes fusion of the large internal repeat to the DSL region. *J Virol* 43, 952-968.
- Brady G., MacArthur G. J. and Farrell P. J. 2007. Epstein-Barr virus and Burkitt lymphoma. *J Clin Pathol* 60, 1397-1402.
- Bransteitter R., Pham P., Scharff M. D. and Goodman M. F. 2003. Activation-induced cytidine deaminase deaminates deoxycytidine on single-stranded DNA but requires the action of RNase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4102-4107.
- Bräuninger A., Goossens T., Rajewsky K. and Küppers R. 2001. Regulation of immunoglobulin light chain gene rearrangements during early B cell development in the human. *Eur J Immunol* 31, 3631-3637.
- Bräuninger A., Küppers R., Spieker T., Siebert R., Strickler J. G., Schlegelberger B., Rajewsky K. and Hansmann M. L. 1999. Molecular analysis of single B cells from T cell-rich B-cell lymphoma shows

- the derivation of the tumor cells from mutating germinal center B cells and exemplifies means by which immunoglobulin genes are modified in germinal center B cells. *Blood* 93, 2679-2687.
- Bräuninger A., Küppers R., Strickler J. G., Wacker H. H., Rajewsky K. and Hansmann M. L. 1997. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in lymphocyte predominant Hodgkin disease represent clonal populations of germinal center-derived tumor B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 9337-9342.
- Bräuninger A., Schmitz R., Bechtel D., Renne C., Hansmann M. L. and Küppers R. 2006. Molecular biology of Hodgkin's and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's lymphoma. *Int J Cancer* 118, 1853-1861.
- Bräuninger A., Spieker T., Mottock A., Baur A. S., Küppers R. and Hansmann M.-L. 2003. Epstein-Barr virus (EBV)-positive lymphoproliferations in posttransplant patients show immunoglobulin V gene mutation patterns suggesting interference of EBV with normal B cell differentiation processes. *Eur. J. Immunol.* 33, 1593-1602.
- Brink A. A., Dukers D. F., van den Brule A. J., Oudejans J. J., Middeldorp J. M., Meijer C. J. and Jiwa M. 1997. Presence of Epstein-Barr virus latency type III at the single cell level in post-transplantation lymphoproliferative disorders and AIDS related lymphomas. *J Clin Pathol* 50, 911-918.
- Brousset P., Schlaifer D., Meggetto F., Bachmann E., Rothenberger S., Pris J., Delsol G. and Knecht H. 1994. Persistence of the same viral strain in early and late relapses of Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease. *Blood* 84, 2447-2451.
- Brown K. S., Ryder S. D., Irving W. L., Sim R. B. and Hickling T. P. 2007. Mannan binding lectin and viral hepatitis. *Immunol Lett* 108, 34-44.
- Burgstahler R., Kempkes B., Steube K. and Lipp M. 1995. Expression of the chemokine receptor BLR2/EBI1 is specifically transactivated by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *Biochem Biophys Res Commun* 215, 737-743.
- Cabannes E., Khan G., Aillet F., Jarrett R. F. and Hay R. T. 1999. Mutations in the I κ B α gene in Hodgkin's disease suggest a tumour suppressor role for I κ B α . *Oncogene* 18, 3063-3070.
- Cahir McFarland E. D., Izumi K. M. and Mosialos G. 1999. Epstein-barr virus transformation: involvement of latent membrane protein 1-mediated activation of NF-kappaB. *Oncogene* 18, 6959-6964.
- Cahir-McFarland E. D., Davidson D. M., Schauer S. L., Duong J. and Kieff E. 2000. NF-kappa B inhibition causes spontaneous apoptosis in Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6055-6060.
- Caldwell R. G., Wilson J. B., Anderson S. J. and Longnecker R. 1998. Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* 9, 405-411.
- Callan M. F., Tan L., Annels N., Ogg G. S., Wilson J. D., O'Callaghan C. A., Steven N., McMichael A. J. and Rickinson A. B. 1998. Direct visualization of antigen-specific CD8⁺ T cells during the primary immune response to Epstein-Barr virus In vivo. *J Exp Med* 187, 1395-1402.
- Capello D., Cerri M., Muti G., Berra E., Oreste P., Deambrogi C., Rossi D., Dotti G., Conconi A., Vigano M., Magrini U., Ippoliti G., Morra E., Gloghini A., Rambaldi A., Paulli M., Carbone A. and Gaidano G. 2003. Molecular histogenesis of posttransplantation lymphoproliferative disorders. *Blood* 102, 3775-3785.
- Capello D., Martini M., Gloghini A., Cerri M., Rasi S., Deambrogi C., Rossi D., Spina M., Tirelli U., Larocca L. M., Carbone A. and Gaidano G. 2008. Molecular analysis of immunoglobulin variable genes in human immunodeficiency virus-related non-Hodgkin's lymphoma reveals implications for disease pathogenesis and histogenesis. *Haematologica* 93, 1178-1185.

- Capello D., Rossi D. and Gaidano G. 2005. Post-transplant lymphoproliferative disorders: molecular basis of disease histogenesis and pathogenesis. *Hematol Oncol* 23, 61-67.
- Carbone A. and Gloghini A. 2005. AIDS-related lymphomas: from pathogenesis to pathology. *Br J Haematol* 130, 662-670.
- Carter K. L., Cahir-McFarland E. and Kieff E. 2002. Epstein-barr virus-induced changes in B-lymphocyte gene expression. *J Virol* 76, 10427-10436.
- Casola S., Otipoby K. L., Alimzhanov M., Humme S., Uyttersprot N., Kutok J. L., Carroll M. C. and Rajewsky K. 2004. B cell receptor signal strength determines B cell fate. *Nat Immunol* 5, 317-327.
- Cattoretti G., Buttner M., Shaknovich R., Kremmer E., Alobeid B. and Niedobitek G. 2006. Nuclear and cytoplasmic AID in extrafollicular and germinal center B cells. *Blood* 107, 3967-3975.
- Cattoretti G., Chang C. C., Cechova K., Zhang J., Ye B. H., Falini B., Louie D. C., Offit K., Chaganti R. S. K. and Dalla-Favera R. 1995. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood* 86, 45-53.
- Cattoretti G., Zhang J., Cleary A., Lederman S., Gaidano G., Carbone A., Chaganti R. S. and Dalla-Favera R. 1997. Downregulation of BCL-6 gene expression by CD40 and EBV latent membrane protein-1 (LMP-1) and its block in lymphoma carrying BCL-6 rearrangements. *Blood* 90, 175a (abstract).
- Cerri M., Capello D., Muti G., Rambaldi A., Paulli M., Gloghini A., Berra E., Deambrogi C., Rossi D., Franceschetti S., Conconi A., Morra E., Pasqualucci L., Carbone A. and Gaidano G. 2004. Aberrant somatic hypermutation in post-transplant lymphoproliferative disorders. *Br J Haematol* 127, 362-364.
- Chaganti S., Bell A. I., Pastor N. B., Milner A. E., Drayson M., Gordon J. and Rickinson A. B. 2005. Epstein-Barr virus infection in vitro can rescue germinal center B cells with inactivated immunoglobulin genes. *Blood* 106, 4249-4252.
- Chaganti S., Ma C. S., Bell A. I., Croom-Carter D., Hislop A. D., Tangye S. G. and Rickinson A. B. 2008. Epstein-Barr virus persistence in the absence of conventional memory B cells: IgM+IgD+CD27+ B cells harbor the virus in X-linked lymphoproliferative disease patients. *Blood* 112, 672-679.
- Chapman C. J., Mockridge C. I., Rowe M., Rickinson A. B. and Stevenson F. K. 1995a. Analysis of VH genes used by neoplastic B cells in endemic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation and intracлонаl heterogeneity. *Blood* 85, 2176-2181.
- Chapman C. J., Spellerberg M. B., Hamblin T. J. and Stevenson F. K. 1995b. Pattern of usage of the VH4-21 gene by B lymphocytes in a patient with EBV infection indicates ongoing mutation and class switching. *Mol Immunol* 32, 347-353.
- Chapman C. J., Zhou J. X., Gregory C., Rickinson A. B. and Stevenson F. K. 1996. VH and VL gene analysis in sporadic Burkitt's lymphoma shows somatic hypermutation, intracлонаl heterogeneity, and a role for antigen selection. *Blood* 88, 3562-3568.
- Chaudhuri J., Khuong C. and Alt F. W. 2004. Replication protein A interacts with AID to promote deamination of somatic hypermutation targets. *Nature* 430, 992-998.
- Chaudhuri J., Tian M., Khuong C., Chua K., Pinaud E. and Alt F. W. 2003. Transcription-targeted DNA deamination by the AID antibody diversification enzyme. *Nature* 422, 726-730.
- Chen F., Zou J. Z., di Renzo L., Winberg G., Hu L. F., Klein E., Klein G. and Ernberg I. 1995. A subpopulation of normal B cells latently infected with Epstein-Barr virus resembles Burkitt lymphoma cells in expressing EBNA-1 but not EBNA-2 or LMP1. *J Virol* 69, 3752-3758.

- Cherney B. W., Bhatia K. G., Sgadari C., Gutierrez M. I., Mostowski H., Pike S. E., Gupta G., Magrath I. T. and Tosato G. 1997. Role of the p53 tumor suppressor gene in the tumorigenicity of Burkitt's lymphoma cells. *Cancer Res* 57, 2508-2515.
- Coller H. A. and Coller B. S. 1986. Poisson statistical analysis of repetitive subcloning by the limiting dilution technique as a way of assessing hybridoma monoclonality. *Methods Enzymol* 121, 412-417.
- Conacher M., Callard R., McAulay K., Chapel H., Webster D., Kumararatne D., Chandra A., Spickett G., Hopwood P. A. and Crawford D. H. 2005. Epstein-Barr virus can establish infection in the absence of a classical memory B-cell population. *J Virol* 79, 11128-11134.
- Corbett S. J., Tomlinson I. M., Sonnhhammer E. L., Buck D. and Winter G. 1997. Sequence of the human immunoglobulin diversity (D) segment locus: a systematic analysis provides no evidence for the use of DIR segments, inverted D segments, "minor" D segments or D-D recombination. *J Mol Biol* 270, 587-597.
- Cordier M., Calender A., Billaud M., Zimmer U., Rousselet G., Pavlish O., Banchereau J., Tursz T., Bornkamm G. and Lenoir G. M. 1990. Stable transfection of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 in lymphoma cells containing the EBV P3HR1 genome induces expression of B-cell activation molecules CD21 and CD23. *J Virol* 64, 1002-1013.
- Dalbies-Tran R., Stigger-Rosser E., Dotson T. and Sample C. E. 2001. Amino acids of Epstein-Barr virus nuclear antigen 3A essential for repression of Jkappa-mediated transcription and their evolutionary conservation. *J Virol* 75, 90-99.
- Dawson C. W., Tramontanis G., Eliopoulos A. G. and Young L. S. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* 278, 3694-3704.
- de Yebenes V. G. and Ramiro A. R. 2006. Activation-induced deaminase: light and dark sides. *Trends Mol Med* 12, 432-439.
- Deacon E. M., Pallesen G., Niedobitek G., Crocker J., Brooks L., Rickinson A. B. and Young L. S. 1993. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J Exp Med* 177, 339-349.
- Delecluse H. J., Feederle R., O'Sullivan B. and Tanriere P. 2007. Epstein Barr virus-associated tumours: an update for the attention of the working pathologist. *J Clin Pathol* 60, 1358-1364.
- Dent A. L., Shaffer A. L., Yu X., Allman D. and Staudt L. M. 1997. Control of inflammation, cytokine expression, and germinal center formation by BCL-6. *Science* 276, 589-592.
- Devergne O., Hatzivassiliou E., Izumi K. M., Kaye K. M., Kleijnen M. F., Kieff E. and Mosialos G. 1996. Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 16, 7098-7108.
- Dhordain P., Albagli O., Lin R. J., Ansieau S., Quief S., Leutz A., Kerckaert J. P., Evans R. M. and Leprince D. 1997. Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 10762-10767.
- Dickerson S. K., Market E., Besmer E. and Papavasiliou F. N. 2003. AID mediates hypermutation by deaminating single stranded DNA. *J Exp Med* 197, 1291-1296.
- Dolcetti R. 2007. B lymphocytes and Epstein-Barr virus: the lesson of post-transplant lymphoproliferative disorders. *Autoimmun Rev* 7, 96-101.

- Dorner M., Zucol F., Berger C., Byland R., Melroe G. T., Bernasconi M., Speck R. F. and Nadal D. 2008. Distinct ex vivo susceptibility of B-cell subsets to Epstein-Barr virus infection according to differentiation status and tissue origin. *J Virol* 82, 4400-4412.
- Dorsett Y., McBride K. M., Jankovic M., Gazumyan A., Thai T. H., Robbiani D. F., Di Virgilio M., San-Martin B. R., Heidkamp G., Schwickert T. A., Eisenreich T., Rajewsky K. and Nussenzweig M. C. 2008. MicroRNA-155 suppresses activation-induced cytidine deaminase-mediated Myc-Igh translocation. *Immunity* 28, 630-638.
- Dorsett Y., Robbiani D. F., Jankovic M., Reina-San-Martin B., Eisenreich T. R. and Nussenzweig M. C. 2007. A role for AID in chromosome translocations between c-myc and the IgH variable region. *J Exp Med* 204, 2225-2232.
- Dutton A., O'Neil J. D., Milner A. E., Reynolds G. M., Starczynski J., Crocker J., Young L. S. and Murray P. G. 2004. Expression of the cellular FLICE-inhibitory protein (c-FLIP) protects Hodgkin's lymphoma cells from autonomous Fas-mediated death. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6611-6616.
- Dutton A., Reynolds G. M., Dawson C. W., Young L. S. and Murray P. G. 2005. Constitutive activation of phosphatidylinositol 3 kinase contributes to the survival of Hodgkin's lymphoma cells through a mechanism involving Akt kinase and mTOR. *J Pathol* 205, 498-506.
- Dykstra M. L., Longnecker R. and Pierce S. K. 2001. Epstein-Barr virus coopts lipid rafts to block the signaling and antigen transport functions of the BCR. *Immunity* 14, 57-67.
- Edelman G. M. 1991. Antibody structure and molecular immunology. *Scand J Immunol* 34, 1-22.
- Ehlin-Henriksson B., Gordon J. and Klein G. 2003. B-lymphocyte subpopulations are equally susceptible to Epstein-Barr virus infection, irrespective of immunoglobulin isotype expression. *Immunology* 108, 427-430.
- Emmerich F., Meiser M., Hummel M., Demel G., Foss H. D., Jundt F., Mathas S., Krappmann D., Scheidereit C., Stein H. and Dorken B. 1999. Overexpression of I kappa B alpha without inhibition of NF-kappaB activity and mutations in the I kappa B alpha gene in Reed-Sternberg cells. *Blood* 94, 3129-3134.
- Emmerich F., Theurich S., Hummel M., Haefliger A., Vry M. S., Dohner K., Bommert K., Stein H. and Dorken B. 2003. Inactivating I kappa B epsilon mutations in Hodgkin/Reed-Sternberg cells. *J Pathol* 201, 413-420.
- Epeldegui M., Hung Y. P., McQuay A., Ambinder R. F. and Martinez-Maza O. 2007. Infection of human B cells with Epstein-Barr virus results in the expression of somatic hypermutation-inducing molecules and in the accrual of oncogene mutations. *Mol Immunol* 44, 934-942.
- Epstein M. A., Barr Y. M. and Achong B. G. 1965. Studies with Burkitt's lymphoma. *Wistar Inst Symp Monogr* 4, 69-82.
- Fang T. C., Yashiro-Ohtani Y., Del Bianco C., Knoblock D. M., Blacklow S. C. and Pear W. S. 2007. Notch directly regulates Gata3 expression during T helper 2 cell differentiation. *Immunity* 27, 100-110.
- Farrell P. J., Allan G. J., Shanahan F., Vousden K. H. and Crook T. 1991. p53 is frequently mutated in Burkitt's lymphoma cell lines. *Embo J* 10, 2879-2887.
- Fecteau J. F. and Neron S. 2003. CD40 stimulation of human peripheral B lymphocytes: distinct response from naive and memory cells. *J Immunol* 171, 4621-4629.
- Feddersen R. M. and Van Ness B. G. 1985. Double recombination of a single immunoglobulin kappa-chain allele: implications for the mechanism of rearrangement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 4793-4797.

- Fleisher G., Henle W., Henle G., Lennette E. T. and Biggar R. J. 1979. Primary infection with Epstein-Barr virus in infants in the United States: clinical and serologic observations. *J Infect Dis* 139, 553-558.
- Frey B. and Suppmann a. B. 1995. Demonstration of the Expand PCR System's greater fidelity and higher yields with a lacI-based PCR fidelity assay. Roche, Biochemica No. 2, 8-9.
- Fruehling S., Lee S. K., Herrold R., Frech B., Laux G., Kremmer E., Grasser F. A. and Longnecker R. 1996. Identification of latent membrane protein 2A (LMP2A) domains essential for the LMP2A dominant-negative effect on B-lymphocyte surface immunoglobulin signal transduction. *J Virol* 70, 6216-6226.
- Fruehling S. and Longnecker R. 1997. The immunoreceptor tyrosine-based activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* 235, 241-251.
- Fukita Y., Jacobs H. and Rajewsky K. 1998. Somatic hypermutation in the heavy chain locus correlates with transcription. *Immunity* 9, 105-114.
- Fukuda M. and Longnecker R. 2005. Epstein-Barr virus (EBV) latent membrane protein 2A regulates B-cell receptor-induced apoptosis and EBV reactivation through tyrosine phosphorylation. *J Virol* 79, 8655-8660.
- Gaidano G., Ballerini P., Gong J. Z., Inghirami G., Neri A., Newcomb E. W., Magrath I. T., Knowles D. M. and Dalla-Favera R. 1991. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 5413-5417.
- Galibert L., Burdin N., de Saint-Vis B., Garrone P., Van Kooten C., Banchereau J. and Rousset F. 1996. CD40 and B cell antigen receptor dual triggering of resting B lymphocytes turns on a partial germinal center phenotype. *J Exp Med* 183, 77-85.
- Gil Y., Levy-Nabot S., Steinitz M. and Laskov R. 2007. Somatic mutations and activation-induced cytidine deaminase (AID) expression in established rheumatoid factor-producing lymphoblastoid cell line. *Mol Immunol* 44, 494-505.
- Gilligan K., Sato H., Rajadurai P., Busson P., Young L., Rickinson A., Tursz T. and Raab-Traub N. 1990. Novel transcription from the Epstein-Barr virus terminal EcoRI fragment, DJH_{et}, in a nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 64, 4948-4956.
- Gires O., Kohlhuber F., Kilger E., Baumann M., Kieser A., Kaiser C., Zeidler R., Scheffer B., Ueffing M. and Hammerschmidt W. 1999. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *EMBO J* 18, 3064-3073.
- Gires O., Zimmer-Strobl U., Gonnella R., Ueffing M., Marschall G., Zeidler R., Pich D. and Hammerschmidt W. 1997. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *EMBO J* 16, 6131-6140.
- Golden H. D., Chang R. S., Prescott W., Simpson E. and Cooper T. Y. 1973. Leukocyte-transforming agent: prolonged excretion by patients with mononucleosis and excretion by normal individuals. *J Infect Dis* 127, 471-473.
- Goodnow C. C., Crosbie J., Adelstein S., Lavoie T. B., Smith-Gill S. J., Brink R. A., Pritchard-Briscoe H., Wotherspoon J. S., Loblay R. H., Raphael K. and et al. 1988. Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice. *Nature* 334, 676-682.
- Goossens T., Klein U. and Küppers R. 1998. Frequent occurrence of deletions and duplications during somatic hypermutation: Implications for oncogene translocations and heavy chain disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 2463-2468.

- Gordadze A. V., Peng R., Tan J., Liu G., Sutton R., Kempkes B., Bornkamm G. W. and Ling P. D. 2001. Notch1IC partially replaces EBNA2 function in B cells immortalized by Epstein-Barr virus. *J Virol* 75, 5899-5912.
- Gordon M. S., Kanegai C. M., Doerr J. R. and Wall R. 2003. Somatic hypermutation of the B cell receptor genes B29 (Igbeta, CD79b) and mb1 (Igalpha, CD79a). *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 4126-4131.
- Grässer F. A., Murray P. G., Kremmer E., Klein K., Remberger K., Feiden W., Reynolds G., Niedobitek G., Young L. S. and Mueller-Lantzsch N. 1994. Monoclonal antibodies directed against the Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen 1 (EBNA1): immunohistologic detection of EBNA1 in the malignant cells of Hodgkin's disease. *Blood* 84, 3792-3798.
- Greeve J., Philipsen A., Krause K., Klapper W., Heidorn K., Castle B. E., Janda J., Marcu K. B. and Parwaresch R. 2003. Expression of activation-induced cytidine deaminase in human B-cell non-Hodgkin lymphomas. *Blood* 101, 3574-3580.
- Gregory C. D., Edwards C. F., Milner A., Wiels J., Lipinski M., Rowe M., Tursz T. and Rickinson A. B. 1988. Isolation of a normal B cell subset with a Burkitt-like phenotype and transformation in vitro with Epstein-Barr virus. *Int J Cancer* 42, 213-220.
- Greiner A., Tobollik S., Buettner M., Jungnickel B., Herrmann K., Kremmer E. and Niedobitek G. 2005. Differential expression of activation-induced cytidine deaminase (AID) in nodular lymphocyte-predominant and classical Hodgkin lymphoma. *J Pathol* 205, 541-547.
- Grossberg A. L., Stelos P. and Pressman D. 1962. Structure of fragments of antibody molecules as revealed by reduction of exposed disulfide bonds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1203-1209.
- Gualandi G., Giselico L., Carloni M., Palitti F., Mosesso P. and Alfonsi A. M. 2001. Enhancement of genetic instability in human B cells by Epstein-Barr virus latent infection. *Mutagenesis* 16, 203-208.
- Guasparri I., Bubman D. and Cesarman E. 2008. EBV LMP2A affects LMP1-mediated NF-kappaB signaling and survival of lymphoma cells by regulating TRAF2 expression. *Blood* 111, 3813-3820.
- Haan K. M., Kwok W. W., Longnecker R. and Speck P. 2000. Epstein-Barr virus entry utilizing HLA-DP or HLA-DQ as a coreceptor. *J Virol* 74, 2451-2454.
- Haan K. M. and Longnecker R. 2000. Coreceptor restriction within the HLA-DQ locus for Epstein-Barr virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9252-9257.
- Harada S. and Kieff E. 1997. Epstein-Barr virus nuclear protein LP stimulates EBNA-2 acidic domain-mediated transcriptional activation. *J Virol* 71, 6611-6618.
- Harris R. S., Croom-Carter D. S., Rickinson A. B. and Neuberger M. S. 2001. Epstein-Barr virus and the somatic hypermutation of immunoglobulin genes in Burkitt's lymphoma cells. *J Virol* 75, 10488-10492.
- Hauser A. E., Junt T., Mempel T. R., Sneddon M. W., Kleinstein S. H., Henrickson S. E., von Andrian U. H., Shlomchik M. J. and Haberman A. M. 2007a. Definition of germinal-center B cell migration in vivo reveals predominant intrazonal circulation patterns. *Immunity* 26, 655-667.
- Hauser A. E., Shlomchik M. J. and Haberman A. M. 2007b. In vivo imaging studies shed light on germinal-centre development. *Nat Rev Immunol* 7, 499-504.
- Hauser J., Sveshnikova N., Wallenius A., Baradaran S., Saarikettu J. and Grundstrom T. 2008. B-cell receptor activation inhibits AID expression through calmodulin inhibition of E-proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1267-1272.

- He B., Raab-Traub N., Casali P. and Cerutti A. 2003. EBV-encoded latent membrane protein 1 cooperates with BAFF/BLyS and APRIL to induce T cell-independent Ig heavy chain class switching. *J Immunol* 171, 5215-5224.
- Henderson S., Rowe M., Gregory C., Croom-Carter D., Wang F., Longnecker R., Kieff E. and Rickinson A. 1991. Induction of bcl-2 expression by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 protects infected B cells from programmed cell death. *Cell* 65, 1107-1115.
- Henle G., Henle W. and Diehl V. 1968. Relation of Burkitt's tumor-associated herpes-type virus to infectious mononucleosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 59, 94-101.
- Henle W., Diehl V., Kohn G., Zur Hausen H. and Henle G. 1967. Herpes-type virus and chromosome marker in normal leukocytes after growth with irradiated Burkitt cells. *Science* 157, 1064-1065.
- Herbst H., Dallenbach F., Hummel M., Niedobitek G., Pileri S., Muller-Lantzsch N. and Stein H. 1991. Epstein-Barr virus latent membrane protein expression in Hodgkin and Reed-Sternberg cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4766-4770.
- Hieter P. A., Maizel J. V., Jr. and Leder P. 1982. Evolution of human immunoglobulin kappa J region genes. *J Biol Chem* 257, 1516-1522.
- Hinz M., Lemke P., Anagnostopoulos I., Hacker C., Krappmann D., Mathas S., Dorken B., Zenke M., Stein H. and Scheidereit C. 2002. Nuclear factor kappaB-dependent gene expression profiling of Hodgkin's disease tumor cells, pathogenetic significance, and link to constitutive signal transducer and activator of transcription 5a activity. *J Exp Med* 196, 605-617.
- Hjalgrim H., Askling J., Rostgaard K., Hamilton-Dutoit S., Frisch M., Zhang J. S., Madsen M., Rosdahl N., Konradsen H. B., Storm H. H. and Melbye M. 2003. Characteristics of Hodgkin's lymphoma after infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 349, 1324-1332.
- Ho M., Miller G., Atchison R. W., Breinig M. K., Dummer J. S., Andiman W., Starzl T. E., Eastman R., Griffith B. P., Hardesty R. L. and et al. 1985. Epstein-Barr virus infections and DNA hybridization studies in posttransplantation lymphoma and lymphoproliferative lesions: the role of primary infection. *J Infect Dis* 152, 876-886.
- Hochberg D., Middeldorp J. M., Catalina M., Sullivan J. L., Luzuriaga K. and Thorley-Lawson D. A. 2004a. Demonstration of the Burkitt's lymphoma Epstein-Barr virus phenotype in dividing latently infected memory cells in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 239-244.
- Hochberg D., Souza T., Catalina M., Sullivan J. L., Luzuriaga K. and Thorley-Lawson D. A. 2004b. Acute infection with Epstein-Barr virus targets and overwhelms the peripheral memory B-cell compartment with resting, latently infected cells. *J Virol* 78, 5194-5204.
- Höfelmayr H., Strobl L. J., Marschall G., Bornkamm G. W. and Zimmer-Strobl U. 2001. Activated Notch1 can transiently substitute for EBNA2 in the maintenance of proliferation of LMP1-expressing immortalized B cells. *J Virol* 75, 2033-2040.
- Hömig-Hölzel C., Hojer C., Rastelli J., Casola S., Strobl L. J., Müller W., Quintanilla-Martinez L., Gewies A., Ruland J., Rajewsky K. and Zimmer-Strobl U. 2008. Constitutive CD40 signaling in B cells selectively activates the noncanonical NF-kappaB pathway and promotes lymphomagenesis. *J Exp Med* 205, 1317-1329.
- Howe J. G. and Steitz J. A. 1986. Localization of Epstein-Barr virus-encoded small RNAs by in situ hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 9006-9010.

- Hsieh J. J. and Hayward S. D. 1995. Masking of the CBF1/RBPJ kappa transcriptional repression domain by Epstein-Barr virus EBNA2. *Science* 268, 560-563.
- Hudnall S. D., Ge Y., Wei L., Yang N. P., Wang H. Q. and Chen T. 2005. Distribution and phenotype of Epstein-Barr virus-infected cells in human pharyngeal tonsils. *Mod Pathol* 18, 519-527.
- Hurley E. A. and Thorley-Lawson D. A. 1988. B cell activation and the establishment of Epstein-Barr virus latency. *J Exp Med* 168, 2059-2075.
- Ikeda A., Caldwell R. G., Longnecker R. and Ikeda M. 2003. Itchy, a Nedd4 ubiquitin ligase, downregulates latent membrane protein 2A activity in B-cell signaling. *J Virol* 77, 5529-5534.
- Ingham R. J., Raaijmakers J., Lim C. S., Mbamalu G., Gish G., Chen F., Matskova L., Ernberg I., Winberg G. and Pawson T. 2005. The Epstein-Barr virus protein, latent membrane protein 2A, co-opts tyrosine kinases used by the T cell receptor. *J Biol Chem* 280, 34133-34142.
- Irsch J. (1996) Mechanismus und Regulation des Immunglobulinklassenwechsels beim Menschen. Universität Köln, Köln.
- Izumi K. M., Cahir McFarland E. D., Ting A. T., Riley E. A., Seed B. and Kieff E. D. 1999. The Epstein-Barr virus oncoprotein latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated proteins TRADD and receptor-interacting protein (RIP) but does not induce apoptosis or require RIP for NF-kappaB activation. *Mol Cell Biol* 19, 5759-5767.
- Jacob J., Kelsoe G., Rajewsky K. and Weiss U. 1991. Intraclonal generation of antibody mutants in germinal centres. *Nature* 354, 389-392.
- Jaffe E. S., Harris N. L., Stein H., Vardiman J. W. 2001. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Tumors of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC, Lyon.
- Janeway C. A., Jr. and Medzhitov R. 2002. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 20, 197-216.
- Janeway C. A. u. T., T. 1997. Immunobiology. London: Curren Biology Ltd.
- Jochner N., Eick D., Zimmer-Strobl U., Pawlita M., Bornkamm G. W. and Kempkes B. 1996. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 is a transcriptional suppressor of the immunoglobulin mu gene: implications for the expression of the translocated c-myc gene in Burkitt's lymphoma cells. *Embo J* 15, 375-382.
- Johannsen E., Miller C. L., Grossman S. R. and Kieff E. 1996. EBNA-2 and EBNA-3C extensively and mutually exclusively associate with RBPJkappa in Epstein-Barr virus-transformed B lymphocytes. *J Virol* 70, 4179-4183.
- Johansen L. M., Deppmann C. D., Erickson K. D., Coffin W. F., 3rd, Thornton T. M., Humphrey S. E., Martin J. M. and Taparowsky E. J. 2003. EBNA2 and activated Notch induce expression of BATF. *J Virol* 77, 6029-6040.
- Joseph A. M., Babcock G. J. and Thorley-Lawson D. A. 2000. Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J Virol* 74, 9964-9971.
- Jox A., Zander T., Küppers R., Irsch J., Kanzler H., Kornacker M., Bohlen H., Diehl V. and Wolf J. 1999. Somatic mutations within the untranslated regions of rearranged Ig genes in a case of classical Hodgkin's disease as a potential cause for the absence of Ig in the lymphoma cells. *Blood* 93, 3964-3972.
- Jundt F., Anagnostopoulos I., Forster R., Mathas S., Stein H. and Dorken B. 2002a. Activated Notch1 signaling promotes tumor cell proliferation and survival in Hodgkin and anaplastic large cell lymphoma. *Blood* 99, 3398-3403.

- Jundt F., Kley K., Anagnostopoulos I., Schulze Probsting K., Greiner A., Mathas S., Scheidereit C., Wirth T., Stein H. and Dorken B. 2002b. Loss of PU.1 expression is associated with defective immunoglobulin transcription in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of classical Hodgkin disease. *Blood* 99, 3060-3062.
- Jungnickel B., Staratschek-Jox A., Bräuninger A., Spieker T., Wolf J., Diehl V., Hansmann M.-L., Rajewsky K. and Küppers R. 2000. Clonal deleterious mutations in the *ikBa* gene in the malignant cells in Hodgkin's disease. *J. Exp. Med.* 191, 395-401.
- Kaiser C., Laux G., Eick D., Jochner N., Bornkamm G. W. and Kempkes B. 1999. The proto-oncogene *c-myc* is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J Virol* 73, 4481-4484.
- Kanzler H., Barrat F. J., Hessel E. M. and Coffman R. L. 2007. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 13, 552-559.
- Kanzler H., Küppers R., Hansmann M. L. and Rajewsky K. 1996. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med* 184, 1495-1505.
- Kawabe T., Naka T., Yoshida K., Tanaka T., Fujiwara H., Suematsu S., Yoshida N., Kishimoto T. and Kikutani H. 1994. The immune responses in CD40-deficient mice: impaired immunoglobulin class switching and germinal center formation. *Immunity* 1, 167-178.
- Kaye K. M., Izumi K. M. and Kieff E. 1993. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 is essential for B-lymphocyte growth transformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 9150-9154.
- Kelly G., Bell A. and Rickinson A. 2002. Epstein-Barr virus-associated Burkitt lymphomagenesis selects for downregulation of the nuclear antigen EBNA2. *Nat Med* 8, 1098-1104.
- Kelly G. L., Milner A. E., Baldwin G. S., Bell A. I. and Rickinson A. B. 2006. Three restricted forms of Epstein-Barr virus latency counteracting apoptosis in *c-myc*-expressing Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14935-14940.
- Kelly G. L., Milner A. E., Tierney R. J., Croom-Carter D. S., Altmann M., Hammerschmidt W., Bell A. I. and Rickinson A. B. 2005. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) gene deletion is consistently linked with EBNA3A, -3B, and -3C expression in Burkitt's lymphoma cells and with increased resistance to apoptosis. *J Virol* 79, 10709-10717.
- Keohavong P. and Thilly W. G. 1989. Fidelity of DNA polymerases in DNA amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 9253-9257.
- Khan G., Coates P. J., Kangro H. O. and Slavin G. 1992. Epstein Barr virus (EBV) encoded small RNAs: targets for detection by in situ hybridisation with oligonucleotide probes. *J Clin Pathol* 45, 616-620.
- Khan G., Miyashita E. M., Yang B., Babcock G. J. and Thorley-Lawson D. A. 1996. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity* 5, 173-179.
- Kieser A., Kaiser C. and Hammerschmidt W. 1999. LMP1 signal transduction differs substantially from TNF receptor 1 signaling in the molecular functions of TRADD and TRAF2. *Embo J* 18, 2511-2521.
- Kieser A., Kilger E., Gires O., Ueffing M., Kolch W. and Hammerschmidt W. 1997. Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 triggers AP-1 activity via the *c-Jun* N-terminal kinase cascade. *Embo J* 16, 6478-6485.
- Kilger E., Kieser A., Baumann M. and Hammerschmidt W. 1998. Epstein-Barr virus-mediated B-cell proliferation is dependent upon latent membrane protein 1, which simulates an activated CD40 receptor. *Embo J* 17, 1700-1709.

- Kintner C. R. and Sugden B. 1979. The structure of the termini of the DNA of Epstein-Barr virus. *Cell* 17, 661-671.
- Klein U., Klein G., Ehlin-Henriksson B., Rajewsky K. and Küppers R. 1995. Burkitt's lymphoma is a malignancy of mature B cells expressing somatically mutated V region genes. *Mol Med* 1, 495-505.
- Klein U., Rajewsky K. and Küppers R. 1998. Human immunoglobulin (Ig)M+IgD+ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J Exp Med* 188, 1679-1689.
- Kluiver J., Poppema S., de Jong D., Blokzijl T., Harms G., Jacobs S., Kroesen B. J. and van den Berg A. 2005. BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol* 207, 243-249.
- Knecht H., Bachmann E., Brousset P., Sandvej K., Nadal D., Bachmann F., Odermatt B. F., Delsol G. and Pallesen G. 1993. Deletions within the LMP1 oncogene of Epstein-Barr virus are clustered in Hodgkin's disease and identical to those observed in nasopharyngeal carcinoma. *Blood* 82, 2937-2942.
- Knowles D. M. 1998. The molecular genetics of post-transplantation lymphoproliferative disorders. *Springer Semin Immunopathol* 20, 357-373.
- Kobayashi R., Takeuchi H., Sasaki M., Hasegawa M. and Hirai K. 1998. Detection of Epstein-Barr virus infection in the epithelial cells and lymphocytes of non-neoplastic tonsils by in situ hybridization and in situ PCR. *Arch Virol* 143, 803-813.
- Kocks C. and Rajewsky K. 1989. Stable expression and somatic hypermutation of antibody V regions in B-cell developmental pathways. *Annu Rev Immunol* 7, 537-559.
- Krauer K. G., Burgess A., Buck M., Flanagan J., Sculley T. B. and Gabrielli B. 2004. The EBNA-3 gene family proteins disrupt the G2/M checkpoint. *Oncogene* 23, 1342-1353.
- Kraus M., Alimzhanov M. B., Rajewsky N. and Rajewsky K. 2004. Survival of resting mature B lymphocytes depends on BCR signaling via the Igalphabeta heterodimer. *Cell* 117, 787-800.
- Kremianskaya M. and Monroe J. G. 2005. Ig-independent Ig beta expression on the surface of B lymphocytes after B cell receptor aggregation. *J Immunol* 174, 1501-1506.
- Kreuz S., Siegmund D., Scheurich P. and Wajant H. 2001. NF-kappaB inducers upregulate cFLIP, a cycloheximide-sensitive inhibitor of death receptor signaling. *Mol Cell Biol* 21, 3964-3973.
- Kroese F. G., Timens W. and Nieuwenhuis P. 1990. Germinal center reaction and B lymphocytes: morphology and function. *Curr Top Pathol* 84, 103-148.
- Kube D., Holtick U., Vockerodt M., Ahmadi T., Haier B., Behrmann I., Heinrich P. C., Diehl V. and Tesch H. 2001. STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines. *Blood* 98, 762-770.
- Kulwichit W., Edwards R. H., Davenport E. M., Baskar J. F., Godfrey V. and Raab-Traub N. 1998. Expression of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces B cell lymphoma in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 11963-11968.
- Küppers R. 2002. Molecular biology of Hodgkin's lymphoma. *Adv Cancer Res* 44, 277-312.
- Küppers R. 2003. B cells under influence: transformation of B cells by Epstein-Barr virus. *Nat Rev Immunol* 3, 801-812.
- Küppers R. 2005. Mechanisms of B-cell lymphoma pathogenesis. *Nat Rev Cancer* 5, 251-262.
- Küppers R. and Dalla-Favera R. 2001. Mechanisms of chromosomal translocations in B cell lymphomas. *Oncogene* 20, 5580-5594.

- Küppers R., Klein U., Schwering I., Distler V., Bräuninger A., Cattoretti G., Tu Y., Stolovitzky G. A., Califano A., Hansmann M. L. and Dalla-Favera R. 2003. Identification of Hodgkin and Reed-Sternberg cell-specific genes by gene expression profiling. *J Clin Invest* 111, 529-537.
- Küppers R. and Rajewsky K. 1998. The origin of Hodgkin and Reed/Sternberg cells in Hodgkin's disease. *Annu. Rev. Immunol.* 16, 471-493.
- Küppers R., Rajewsky K., Zhao M., Simons G., Laumann R., Fischer R. and Hansmann M. L. 1994. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 10962-10966.
- Küppers R., Sonoki T., Satterwhite E., Gesk S., Harder L., Oscier D. G., Tucker P. W., Dyer M. J. and Siebert R. 2002. Lack of somatic hypermutation of IG V(H) genes in lymphoid malignancies with t(2;14)(p13;q32) translocation involving the BCL11A gene. *Leukemia* 16, 937-939.
- Küppers R., Zhao M., Hansmann M. L. and Rajewsky K. 1993. Tracing B cell development in human germinal centres by molecular analysis of single cells picked from histological sections. *EMBO J* 12, 4955-4967.
- Kurth J., Hansmann M. L., Rajewsky K. and Küppers R. 2003. Epstein-Barr virus-infected B cells expanding in germinal centers of infectious mononucleosis patients do not participate in the germinal center reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 4730-4735.
- Kurth J., Spieker T., Wustrow J., Strickler G. J., Hansmann L. M., Rajewsky K. and Küppers R. 2000. EBV-infected B cells in infectious mononucleosis: viral strategies for spreading in the B cell compartment and establishing latency. *Immunity* 13, 485-495.
- Laherty C. D., Hu H. M., Oipari A. W., Wang F. and Dixit V. M. 1992. The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor kappa B. *J Biol Chem* 267, 24157-24160.
- Laichalk L. L. and Thorley-Lawson D. A. 2005. Terminal differentiation into plasma cells initiates the replicative cycle of Epstein-Barr virus in vivo. *J Virol* 79, 1296-1307.
- Lam K. P., Kühn R. and Rajewsky K. 1997. In vivo ablation of surface immunoglobulin on mature B cells by inducible gene targeting results in rapid cell death. *Cell* 90, 1073-1083.
- Lebecque S., de Bouteiller O., Arpin C., Banchereau J. and Liu Y. J. 1997. Germinal center founder cells display propensity for apoptosis before onset of somatic mutation. *J. Exp. Med.* 185, 563-571.
- Lerner M. R., Boyle J. A., Hardin J. A. and Steitz J. A. 1981. Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* 211, 400-402.
- Levitskaya J., Coram M., Levitsky V., Imreh S., Steigerwald-Mullen P. M., Klein G., Kurilla M. G. and Masucci M. G. 1995. Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* 375, 685-688.
- Ling N. R., Hardie D., Lowe J., Johnson G. D., Khan M. and MacLennan I. C. 1989. A phenotypic study of cells from Burkitt lymphoma and EBV-B-lymphoblastoid lines and their relationship to cells in normal lymphoid tissues. *Int J Cancer* 43, 112-118.
- Ling P. D., Ryon J. J. and Hayward S. D. 1993. EBNA-2 of herpesvirus papio diverges significantly from the type A and type B EBNA-2 proteins of Epstein-Barr virus but retains an efficient transactivation domain with a conserved hydrophobic motif. *J Virol* 67, 2990-3003.

- Litinskiy M. B., Nardelli B., Hilbert D. M., He B., Schaffer A., Casali P. and Cerutti A. 2002. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLyS and APRIL. *Nat Immunol* 3, 822-829.
- Liu M., Duke J. L., Richter D. J., Vinuesa C. G., Goodnow C. C., Kleinstein S. H. and Schatz D. G. 2008. Two levels of protection for the B cell genome during somatic hypermutation. *Nature* 451, 841-845.
- Liu Y. J. and Banchereau J. 1997. Regulation of B-cell commitment to plasma cells or to memory B cells. *Semin Immunol* 9, 235-240.
- Liu Y. J., Joshua D. E., Williams G. T., Smith C. A., Gordon J. and MacLennan I. C. 1989. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centres. *Nature* 342, 929-931.
- Longnecker R. 2000. Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence? *Adv. Cancer Res.* 79, 175-200.
- Luftig M., Prinarakis E., Yasui T., Tschritzis T., Cahir-McFarland E., Inoue J., Nakano H., Mak T. W., Yeh W. C., Li X., Akira S., Suzuki N., Suzuki S., Mosialos G. and Kieff E. 2003. Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 activation of NF-kappaB through IRAK1 and TRAF6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15595-15600.
- Luftig M., Yasui T., Soni V., Kang M. S., Jacobson N., Cahir-McFarland E., Seed B. and Kieff E. 2004. Epstein-Barr virus latent infection membrane protein 1 TRAF-binding site induces NIK/IKK alpha-dependent noncanonical NF-kappaB activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 141-146.
- Mackay F., Schneider P., Rennert P. and Browning J. 2003. BAFF AND APRIL: a tutorial on B cell survival. *Annu Rev Immunol* 21, 231-264.
- MacLennan I. C. 1994. Germinal centers. *Annu Rev Immunol* 12, 117-139.
- Mancao C., Altmann M., Jungnickel B. and Hammerschmidt W. 2005. Rescue of "crippled" germinal center B cells from apoptosis by Epstein-Barr virus. *Blood* 106, 4339-4344.
- Mancao C. and Hammerschmidt W. 2007. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A is a B-cell receptor mimic and essential for B-cell survival. *Blood* 110, 3715-3721.
- Mangeney M., Richard Y., Coulaud D., Tursz T. and Wiels J. 1991. CD77: an antigen of germinal center B cells entering apoptosis. *Eur J Immunol* 21, 1131-1140.
- Mangeney M., Rousselet G., Taga S., Tursz T. and Wiels J. 1995. The fate of human CD77+ germinal center B lymphocytes after rescue from apoptosis. *Mol Immunol* 32, 333-339.
- Mannick J. B., Cohen J. I., Birkenbach M., Marchini A. and Kieff E. 1991. The Epstein-Barr virus nuclear protein encoded by the leader of the EBNA RNAs is important in B-lymphocyte transformation. *J Virol* 65, 6826-6837.
- Marafioti T., Hummel M., Anagnostopoulos I., Foss H. D., Falini B., Delsol G., Isaacson P. G., Pileri S. and Stein H. 1997. Origin of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin's disease from a clonal expansion of highly mutated germinal-center B cells. *N Engl J Med* 337, 453-458.
- Martin-Subero J. I., Gesk S., Harder L., Sonoki T., Tucker P. W., Schlegelberger B., Grote W., Novo F. J., Calasanz M. J., Hansmann M. L., Dyer M. J. and Siebert R. 2002. Recurrent involvement of the REL and BCL11A loci in classical Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 1474-1477.
- Mathas S., Hinz M., Anagnostopoulos I., Krappmann D., Lietz A., Jundt F., Bommert K., Mehta-Grigoriou F., Stein H., Dorken B. and Scheidereit C. 2002. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *Embo J* 21, 4104-4113.

- Matsuda F. and Honjo T. 1996. Organization of the human immunoglobulin heavy-chain locus. *Adv Immunol* 62, 1-29.
- McCloskey N., Pound J. D., Holder M. J., Williams J. M., Roberts L. M., Lord J. M. and Gordon J. 1999. The extrafollicular-to-follicular transition of human B lymphocytes: induction of functional globotriaosylceramide (CD77) on high threshold occupancy of CD40. *Eur J Immunol* 29, 3236-3244.
- McKean D., Huppi K., Bell M., Staudt L., Gerhard W. and Weigert M. 1984. Generation of antibody diversity in the immune response of BALB/c mice to influenza virus hemagglutinin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81, 3180-3184.
- Merchant M., Caldwell R. G. and Longnecker R. 2000. The LMP2A ITAM is essential for providing B cells with development and survival signals in vivo. *J Virol* 74, 9115-9124.
- Mevissen M. L., Kwekkeboom J., Goormachtig E., Lindhout E. and de Groot C. 1993. Improvement of EBV transformation and cloning efficiency of human B cells using culture supernatants from lymphoblastoid cell lines. *Hum Antibodies Hybridomas* 4, 66-73.
- Miller C. L., Burkhardt A. L., Lee J. H., Stealey B., Longnecker R., Bolen J. B. and Kieff E. 1995. Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein- tyrosine kinases. *Immunity* 2, 155-166.
- Miller C. L., Lee J. H., Kieff E. and Longnecker R. 1994. An integral membrane protein (LMP2) blocks reactivation of Epstein-Barr virus from latency following surface immunoglobulin crosslinking. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 772-776.
- Miller G., Robinson J., Heston L. and Lipman M. 1974. Differences between laboratory strains of Epstein-Barr virus based on immortalization, abortive infection, and interference. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71, 4006-4010.
- Miyashita E. M., Yang B., Babcock G. J. and Thorley-Lawson D. A. 1997. Identification of the site of Epstein-Barr virus persistence in vivo as a resting B cell. *J Virol* 71, 4882-4891.
- Mohan J., Dement-Brown J., Maier S., Ise T., Kempkes B. and Tolnay M. 2006. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 induces FcRH5 expression through CBF1. *Blood* 107, 4433-4439.
- Monroe J. G. 2006. ITAM-mediated tonic signalling through pre-BCR and BCR complexes. *Nat Rev Immunol* 6, 283-294.
- Monroe J. G., Havran W. L. and Cambier J. C. 1983. B lymphocyte activation: entry into cell cycle is accompanied by decreased expression of IgD but not IgM. *Eur J Immunol* 13, 208-213.
- Mosialos G., Birkenbach M., Yalamanchili R., VanArsdale T., Ware C. and Kieff E. 1995. The Epstein-Barr virus transforming protein LMP1 engages signaling proteins for the tumor necrosis factor receptor family. *Cell* 80, 389-399.
- Muramatsu M., Kinoshita K., Fagarasan S., Yamada S., Shinkai Y. and Honjo T. 2000. Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell* 102, 553-563.
- Muramatsu M., Sankaranand V. S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N. O. and Honjo T. 1999. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J Biol Chem* 274, 18470-18476.
- Müschen M., Küppers R., Spieker T., Bräuninger A., Rajewsky K. and Hansmann M. L. 2001. Molecular single-cell analysis of Hodgkin- and Reed-Sternberg cells harboring unmutated immunoglobulin variable region genes. *Lab. Invest.* 81, 289-295.

- Müschen M., Rajewsky K., Bräuninger A., Baur A. S., Oudejans J. J., Roers A., Hansmann M.-L. and Küppers R. 2000a. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J. Exp. Med.* 191, 387-394.
- Müschen M., Re D., Jungnickel B., Diehl V., Rajewsky K. and Küppers R. 2000b. Somatic mutation of the CD95 gene in human B cells as a side-effect of the germinal center reaction. *J Exp Med* 192, 1833-1840.
- Nemerow G. R., Wolfert R., McNaughton M. E. and Cooper N. R. 1985. Identification and characterization of the Epstein-Barr virus receptor on human B lymphocytes and its relationship to the C3d complement receptor (CR2). *J Virol* 55, 347-351.
- Neri A., Barriga F., Knowles D. M., Magrath I. T. and Dalla-Favera R. 1988. Different regions of the immunoglobulin heavy-chain locus are involved in chromosomal translocations in distinct pathogenetic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 2748-2752.
- Niedobitek G., Agathangelou A., Herbst H., Whitehead L., Wright D. H. and Young L. S. 1997a. Epstein-Barr virus (EBV) infection in infectious mononucleosis: virus latency, replication and phenotype of EBV-infected cells. *J Pathol* 182, 151-159.
- Niedobitek G., Agathangelou A., Steven N. and Young L. S. 2000. Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol Pathol* 53, 37-42.
- Niedobitek G., Herbst H., Young L. S., Brooks L., Masucci M. G., Crocker J., Rickinson A. B. and Stein H. 1992. Patterns of Epstein-Barr virus infection in non-neoplastic lymphoid tissue. *Blood* 79, 2520-2526.
- Niedobitek G., Kremmer E., Herbst H., Whitehead L., Dawson C. W., Niedobitek E., von Ostau C., Rooney N., Grasser F. A. and Young L. S. 1997b. Immunohistochemical detection of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 2A in Hodgkin's disease and infectious mononucleosis. *Blood* 90, 1664-1672.
- Niir H. and Clark E. A. 2002. Regulation of B-cell fate by antigen-receptor signals. *Nat Rev Immunol* 2, 945-956.
- Nitsche F., Bell A. and Rickinson A. 1997. Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol* 71, 6619-6628.
- Pallesen G., Hamilton-Dutoit S. J., Rowe M. and Young L. S. 1991. Expression of Epstein-Barr virus latent gene products in tumour cells of Hodgkin's disease. *Lancet* 337, 320-322.
- Papavasiliou F. N. and Schatz D. G. 2000. Cell-cycle-regulated DNA double-stranded breaks in somatic hypermutation of immunoglobulin genes. *Nature* 408, 216-221.
- Pasqualucci L., Bhagat G., Jankovic M., Compagno M., Smith P., Muramatsu M., Honjo T., Morse H. C., 3rd, Nussenzweig M. C. and Dalla-Favera R. 2008. AID is required for germinal center-derived lymphomagenesis. *Nat Genet* 40, 108-112.
- Pasqualucci L., Guglielmino R., Houldsworth J., Mohr J., Aoufouchi S., Polakiewicz R., Chaganti R. S. and Dalla-Favera R. 2004. Expression of the AID protein in normal and neoplastic B cells. *Blood* 104, 3318-3325.
- Pasqualucci L., Migliazza A., Fracchiolla N., William C., Neri A., Baldini L., Chaganti R. S., Klein U., Küppers R., Rajewsky K. and Dalla-Favera R. 1998. BCL-6 mutations in normal germinal center B

- cells: evidence of somatic hypermutation acting outside Ig loci. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 11816-11821.
- Pasqualucci L., Neumeister P., Goossens T., Nanjangud G., Chaganti R. S., Küppers R. and Dalla-Favera R. 2001. Hypermutation of multiple proto-oncogenes in B-cell diffuse large-cell lymphomas. *Nature* 412, 341-346.
- Pegtel D. M., Middeldorp J. and Thorley-Lawson D. A. 2004. Epstein-Barr virus infection in ex vivo tonsil epithelial cell cultures of asymptomatic carriers. *J Virol* 78, 12613-12624.
- Pelanda R., Schwers S., Sonoda E., Torres R. M., Nemazee D. and Rajewsky K. 1997. Receptor editing in a transgenic mouse model: site, efficiency, and role in B cell tolerance and antibody diversification. *Immunity* 7, 765-775.
- Pelicci P. G., Knowles D. M., 2nd, Magrath I. and Dalla-Favera R. 1986. Chromosomal breakpoints and structural alterations of the c-myc locus differ in endemic and sporadic forms of Burkitt lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 2984-2988.
- Peng C. W., Xue Y., Zhao B., Johannsen E., Kieff E. and Harada S. 2004a. Direct interactions between Epstein-Barr virus leader protein LP and the EBNA2 acidic domain underlie coordinate transcriptional regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 1033-1038.
- Peng C. W., Zhao B. and Kieff E. 2004b. Four EBNA2 domains are important for EBNA1P coactivation. *J Virol* 78, 11439-11442.
- Peng R., Tan J. and Ling P. D. 2000. Conserved regions in the Epstein-Barr virus leader protein define distinct domains required for nuclear localization and transcriptional cooperation with EBNA2. *J Virol* 74, 9953-9963.
- Peters A. and Storb U. 1996. Somatic hypermutation of immunoglobulin genes is linked to transcription initiation. *Immunity* 4, 57-65.
- Petersen-Mahrt S. K., Harris R. S. and Neuberger M. S. 2002. AID mutates *E. coli* suggesting a DNA deamination mechanism for antibody diversification. *Nature* 418, 99-103.
- Pfeffer S., Zavolan M., Grasser F. A., Chien M., Russo J. J., Ju J., John B., Enright A. J., Marks D., Sander C. and Tuschl T. 2004. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304, 734-736.
- Phan R. T. and Dalla-Favera R. 2004. The BCL6 proto-oncogene suppresses p53 expression in germinal-centre B cells. *Nature* 432, 635-639.
- Portis T., Dyck P. and Longnecker R. 2003. Epstein-Barr Virus (EBV) LMP2A induces alterations in gene transcription similar to those observed in Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 102, 4166-4178.
- Portis T. and Longnecker R. 2003. Epstein-Barr Virus LMP2A Interferes with Global Transcription Factor Regulation When Expressed during B-Lymphocyte Development. *J Virol* 77, 105-114.
- Qiu L., Joazeiro C., Fang N., Wang H. Y., Elly C., Altman Y., Fang D., Hunter T. and Liu Y. C. 2000. Recognition and ubiquitination of Notch by Itch, a hect-type E3 ubiquitin ligase. *J Biol Chem* 275, 35734-35737.
- Rabbitts T. H., Hamlyn P. H. and Baer R. 1983. Altered nucleotide sequences of a translocated c-myc gene in Burkitt lymphoma. *Nature* 306, 760-765.
- Radbruch A., Muehlinghaus G., Luger E. O., Inamine A., Smith K. G., Dorner T. and Hiepe F. 2006. Competence and competition: the challenge of becoming a long-lived plasma cell. *Nat Rev Immunol* 6, 741-750.

- Rajewsky K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature* 381, 751-758.
- Rassenti L. Z. and Kipps T. J. 1997. Lack of allelic exclusion in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 185, 1435-1445.
- Rastelli J., Homig-Holzel C., Seagal J., Muller W., Hermann A. C., Rajewsky K. and Zimmer-Strobl U. 2008. LMP1 signaling can replace CD40 signaling in B cells in vivo and has unique features of inducing class-switch recombination to IgG1. *Blood* 111, 1448-1455.
- Ravetch J. V., Siebenlist U., Korsmeyer S., Waldmann T. and Leder P. 1981. Structure of the human immunoglobulin mu locus: characterization of embryonic and rearranged J and D genes. *Cell* 27, 583-591.
- Razanajaona D., Denepoux S., Blanchard D., de Bouteiller O., Liu Y. J., Banchereau J. and Lebecque S. 1997. In vitro triggering of somatic mutation in human naive B cells. *J Immunol* 159, 3347-3353.
- Re D., Müschen M., Ahmadi T., Wickenhauser C., Staratschek-Jox A., Holtick U., Diehl V. and Wolf J. 2001. Oct-2 and Bob-1 deficiency in Hodgkin and Reed Sternberg cells. *Cancer Res.* 61, 2080-2084.
- Renne C., Willenbrock K., Küppers R., Hansmann M. L. and Bräuninger A. 2005. Autocrine- and paracrine-activated receptor tyrosine kinases in classic Hodgkin lymphoma. *Blood* 105, 4051-4059.
- Reth M. and Brummer T. 2004. Feedback regulation of lymphocyte signalling. *Nat Rev Immunol* 4, 269-277.
- Retter M. W. and Nemazee D. 1998. Receptor editing occurs frequently during normal B cell development. *J Exp Med* 188, 1231-1238.
- Revy P., Muto T., Levy Y., Geissmann F., Plebani A., Sanal O., Catalan N., Forveille M., Dufourcq-Labeuise R., Gennery A., Tezcan I., Ersoy F., Kayserili H., Ugazio A. G., Brousse N., Muramatsu M., Notarangelo L. D., Kinoshita K., Honjo T., Fischer A. and Durandy A. 2000. Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell* 102, 565-575.
- Rickinson A. B. and Kieff E. 2001. Epstein-Barr virus. In *Fields Virology* (Edited by Knipe D. M. and Howley P. M.). Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 2575-2627.
- Robertson E. S., Grossman S., Johannsen E., Miller C., Lin J., Tomkinson B. and Kieff E. 1995. Epstein-Barr virus nuclear protein 3C modulates transcription through interaction with the sequence-specific DNA-binding protein J kappa. *J Virol* 69, 3108-3116.
- Rochford R., Hobbs M. V., Garnier J. L., Cooper N. R. and Cannon M. J. 1993. Plasmacytoid differentiation of Epstein-Barr virus-transformed B cells in vivo is associated with reduced expression of viral latent genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 352-356.
- Roes J., Huppi K., Rajewsky K. and Sablitzky F. 1989. V gene rearrangement is required to fully activate the hypermutation mechanism in B cells. *J Immunol* 142, 1022-1026.
- Roholt O., Onoue K. and Pressman D. 1964. Specific Combination of H and L Chains of Rabbit Gamma-Globulins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51, 173-178.
- Rosa M. D., Gottlieb E., Lerner M. R. and Steitz J. A. 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol* 1, 785-796.
- Rose C., Green M., Webber S., Ellis D., Reyes J. and Rowe D. 2001. Pediatric solid-organ transplant recipients carry chronic loads of Epstein-Barr virus exclusively in the immunoglobulin D-negative B-cell compartment. *J Clin Microbiol* 39, 1407-1415.

- Rovedo M. and Longnecker R. 2008. Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A preferentially signals through the Src family kinase Lyn. *J Virol* 82, 8520-8528.
- Saijo K., Schmedt C., Su I. H., Karasuyama H., Lowell C. A., Reth M., Adachi T., Patke A., Santana A. and Tarakhovsky A. 2003. Essential role of Src-family protein tyrosine kinases in NF-kappaB activation during B cell development. *Nat Immunol* 4, 274-279.
- Sanger F., Nicklen S. and Coulson A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Sanz I. 1991. Multiple mechanisms participate in the generation of diversity of human H chain CDR3 regions. *J Immunol* 147, 1720-1729.
- Sawyer R. N., Evans A. S., Niederman J. C. and McCollum R. W. 1971. Prospective studies of a group of Yale University freshmen. I. Occurrence of infectious mononucleosis. *J Infect Dis* 123, 263-270.
- Schauer E., Webber S., Green M. and Rowe D. 2004. Surface immunoglobulin-deficient Epstein-Barr virus-infected B cells in the peripheral blood of pediatric solid-organ transplant recipients. *J Clin Microbiol* 42, 5802-5810.
- Schauer E., Webber S., Kingsley L., Green M. and Rowe D. 2008. Increased Ig-null B lymphocytes in the peripheral blood of pediatric solid organ transplant recipients with elevated Epstein-Barr viral loads. *Pediatr Transplant*.
- Scheffold A., Miltenyi S. and Radbruch A. 1995. Magnetofluorescent liposomes for increased sensitivity of immunofluorescence. *Immunotechnology* 1, 127-137.
- Schiemann B., Gommerman J. L., Vora K., Cachero T. G., Shulga-Morskaya S., Dobles M., Frew E. and Scott M. L. 2001. An essential role for BAFF in the normal development of B cells through a BCMA-independent pathway. *Science* 293, 2111-2114.
- Schlee M., Krug T., Gires O., Zeidler R., Hammerschmidt W., Mailhammer R., Laux G., Sauer G., Lovric J. and Bornkamm G. W. 2004. Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis: activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV. *J Virol* 78, 3941-3952.
- Schmitz R., Hansmann M. L., Martin-Subero J. I., Bohle V., Hartmann S., Mechttersheimer G., Klapper W., Giefing M., Stanella J., Siebert R. and Küppers R. 2008. TNFAIP3 (A20) is a tumor suppressor gene in Hodgkin lymphoma and primary mediastinal B cell lymphoma. Manuscript submitted.
- Schmitz R., Renne C., Rosenquist R., Tinguely M., Distler V., Menestrina F., Lestani M., Stankovic T., Austen B., Bräuninger A., Hansmann M. L. and Küppers R. 2005. Insights into the multistep transformation process of lymphomas: IgH-associated translocations and tumor suppressor gene mutations in clonally related composite Hodgkin's and non-Hodgkin's lymphomas. *Leukemia* 19, 1452-1458.
- Schneider F., Neugebauer J., Griesse J., Liefold N., Kutz H., Briseno C. and Kieser A. 2008. The viral oncoprotein LMP1 exploits TRADD for signaling by masking its apoptotic activity. *PLoS Biol* 6, e8.
- Schwering I., Bräuninger A., Klein U., Jungnickel B., Tinguely M., Diehl V., Hansmann M. L., Dalla-Favera R., Rajewsky K. and Küppers R. 2003. Loss of the B-lineage-specific gene expression program in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 101, 1505-1512.
- Schwickert T. A., Lindquist R. L., Shakhar G., Livshits G., Skokos D., Kosco-Vilbois M. H., Dustin M. L. and Nussenzweig M. C. 2007. In vivo imaging of germinal centres reveals a dynamic open structure. *Nature* 446, 83-87.

- Sears R., Leone G., DeGregori J. and Nevins J. R. 1999. Ras enhances Myc protein stability. *Mol Cell* 3, 169-179.
- Shaffer A. L., Rosenwald A. and Staudt L. M. 2002. Lymphoid malignancies: the dark side of B-cell differentiation. *Nat Rev Immunol* 2, 920-932.
- Shaffer A. L., Yu X., He Y., Boldrick J., Chan E. P. and Staudt L. M. 2000. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity* 13, 199-212.
- Shembade N., Harhaj N. S., Parvatiyar K., Copeland N. G., Jenkins N. A., Matesic L. E. and Harhaj E. W. 2008. The E3 ligase Itch negatively regulates inflammatory signaling pathways by controlling the function of the ubiquitin-editing enzyme A20. *Nat Immunol* 9, 254-262.
- Shen H. M., Peters A., Baron B., Zhu X. and Storb U. 1998. Mutation of BCL-6 gene in normal B cells by the process of somatic hypermutation of Ig genes. *Science* 280, 1750-1752.
- Skinninger B. F., Elia A. J., Gascoyne R. D., Patterson B., Trumper L., Kapp U. and Mak T. W. 2002. Signal transducer and activator of transcription 6 is frequently activated in Hodgkin and Reed-Sternberg cells of Hodgkin lymphoma. *Blood* 99, 618-626.
- Souza T. A., Stollar B. D., Sullivan J. L., Luzuriaga K. and Thorley-Lawson D. A. 2005. Peripheral B cells latently infected with Epstein-Barr virus display molecular hallmarks of classical antigen-selected memory B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 18093-18098.
- Souza T. A., Stollar B. D., Sullivan J. L., Luzuriaga K. and Thorley-Lawson D. A. 2007. Influence of EBV on the peripheral blood memory B cell compartment. *J Immunol* 179, 3153-3160.
- Sponder L. C., Cornish G. H., Sullivan A. and Farrell P. J. 2002. Expression of transcription factor AML-2 (RUNX3, CBF(alpha)-3) is induced by Epstein-Barr virus EBNA-2 and correlates with the B-cell activation phenotype. *J Virol* 76, 4919-4927.
- Stavnezer J., Guikema J. E. and Schrader C. E. 2008. Mechanism and regulation of class switch recombination. *Annu Rev Immunol* 26, 261-292.
- Strobl L. J., Hofelmayer H., Stein C., Marschall G., Brielmeier M., Laux G., Bornkamm G. W. and Zimmer-Strobl U. 1997. Both Epstein-Barr viral nuclear antigen 2 (EBNA2) and activated Notch1 transactivate genes by interacting with the cellular protein RBP-J kappa. *Immunobiology* 198, 299-306.
- Summers H., Barwell J. A., Pfuetzner R. A., Edwards A. M. and Frappier L. 1996. Cooperative assembly of EBNA1 on the Epstein-Barr virus latent origin of replication. *J Virol* 70, 1228-1231.
- Sun C. C. and Thorley-Lawson D. A. 2007. Plasma cell-specific transcription factor XBP-1s binds to and transactivates the Epstein-Barr virus BZLF1 promoter. *J Virol* 81, 13566-13577.
- Swanson-Mungerson M. A., Caldwell R. G., Bultema R. and Longnecker R. 2005. Epstein-Barr virus LMP2A alters in vivo and in vitro models of B-cell anergy, but not deletion, in response to autoantigen. *J Virol* 79, 7355-7362.
- Takizawa M., Tolarova H., Li Z., Dubois W., Lim S., Callen E., Franco S., Mosaico M., Feigenbaum L., Alt F. W., Nussenzweig A., Potter M. and Casellas R. 2008. AID expression levels determine the extent of cMyc oncogenic translocations and the incidence of B cell tumor development. *J Exp Med*.
- Tanner J., Weis J., Fearon D., Whang Y. and Kieff E. 1987. Epstein-Barr virus gp350/220 binding to the B lymphocyte C3d receptor mediates adsorption, capping, and endocytosis. *Cell* 50, 203-213.
- Tao Q., Robertson K. D., Manns A., Hildesheim A. and Ambinder R. F. 1998. Epstein-Barr virus (EBV) in endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. *Blood* 91, 1373-1381.

- Teng G., Hakimpour P., Landgraf P., Rice A., Tuschl T., Casellas R. and Papavasiliou F. N. 2008. MicroRNA-155 is a negative regulator of activation-induced cytidine deaminase. *Immunity* 28, 621-629.
- Thorley-Lawson D. A. 2001. Epstein-Barr virus: exploiting the immune system. *Nat Rev Immunol* 1, 75-82.
- Thorley-Lawson D. A. 2005. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol* 116, 251-261.
- Tiegs S. L., Russell D. M. and Nemazee D. 1993. Receptor editing in self-reactive bone marrow B cells. *J Exp Med* 177, 1009-1020.
- Tierney R., Nagra J., Hutchings I., Shannon-Lowe C., Altmann M., Hammerschmidt W., Rickinson A. and Bell A. 2007. Epstein-Barr virus exploits BSAP/Pax5 to achieve the B-cell specificity of its growth-transforming program. *J Virol* 81, 10092-10100.
- Tierney R. J., Steven N., Young L. S. and Rickinson A. B. 1994. Epstein-Barr virus latency in blood mononuclear cells: analysis of viral gene transcription during primary infection and in the carrier state. *J Virol* 68, 7374-7385.
- Timms J. M., Bell A., Flavell J. R., Murray P. G., Rickinson A. B., Traverse-Glehen A., Berger F. and Delecluse H. J. 2003. Target cells of Epstein-Barr-virus (EBV)-positive post-transplant lymphoproliferative disease: similarities to EBV-positive Hodgkin's lymphoma. *Lancet* 361, 217-223.
- Tinguely M., Rosenquist R., Sundstrom C., Amini R. M., Küppers R., Hansmann M. L. and Bräuninger A. 2003. Analysis of a clonally related mantle cell and Hodgkin lymphoma indicates Epstein-Barr virus infection of a Hodgkin/Reed-Sternberg cell precursor in a germinal center. *Am J Surg Pathol* 27, 1483-1488.
- Tobollik S., Meyer L., Buettner M., Klemmer S., Kempkes B., Kremmer E., Niedobitek G. and Jungnickel B. 2006. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 inhibits AID expression during EBV-driven B-cell growth. *Blood* 108, 3859-3864.
- Tomkinson B., Robertson E. and Kieff E. 1993. Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA-3A and EBNA-3C are essential for B-lymphocyte growth transformation. *J Virol* 67, 2014-2025.
- Tomlinson I. M., Cox J. P., Gherardi E., Lesk A. M. and Chothia C. 1995. The structural repertoire of the human V kappa domain. *Embo J* 14, 4628-4638.
- Tonegawa S. 1983. Somatic generation of antibody diversity. *Nature* 302, 575-581.
- Torlakovic E., Tierens A., Dang H. D. and Delabie J. 2001. The transcription factor PU.1, necessary for B-cell development is expressed in lymphocyte predominance, but not classical Hodgkin's disease. *Am J Pathol* 159, 1807-1814.
- Tugizov S. M., Berline J. W. and Palefsky J. M. 2003. Epstein-Barr virus infection of polarized tongue and nasopharyngeal epithelial cells. *Nat Med* 9, 307-314.
- Uchida J., Yasui T., Takaoka-Shichijo Y., Muraoka M., Kulwichit W., Raab-Traub N. and Kikutani H. 1999. Mimicry of CD40 signals by Epstein-Barr virus LMP1 in B lymphocyte responses. *Science* 286, 300-303.
- Vaandrager J. W., Schuurin E., Kluin-Nelemans H. C., Dyer M. J., Raap A. K. and Kluin P. M. 1998. DNA fiber fluorescence in situ hybridization analysis of immunoglobulin class switching in B-cell neoplasia: aberrant CH gene rearrangements in follicle center-cell lymphoma. *Blood* 92, 2871-2878.
- Vasicek T. J. and Leder P. 1990. Structure and expression of the human immunoglobulin lambda genes. *J Exp Med* 172, 609-620.

- Vela J. L., Ait-Azzouzene D., Duong B. H., Ota T. and Nemazee D. 2008. Rearrangement of mouse immunoglobulin kappa deleting element recombining sequence promotes immune tolerance and lambda B cell production. *Immunity* 28, 161-170.
- Vetsika E. K. and Callan M. 2004. Infectious mononucleosis and Epstein-Barr virus. *Expert Rev Mol Med* 6, 1-16.
- Vockerodt M., Morgan S., Kuo M., Wei W., Chukwuma M., Arrand J., Kube D., Gordon J., Young L., Woodman C. and Murray P. 2008. The Epstein-Barr virus oncoprotein, latent membrane protein-1, reprograms germinal centre B cells towards a Hodgkin's Reed-Sternberg-like phenotype. *J Pathol* 216, 83-92.
- Waisman A., Kraus M., Seagal J., Ghosh S., Melamed D., Song J., Sasaki Y., Classen S., Lutz C., Brombacher F., Nitschke L. and Rajewsky K. 2007. IgG1 B cell receptor signaling is inhibited by CD22 and promotes the development of B cells whose survival is less dependent on Ig alpha/beta. *J Exp Med* 204, 747-758.
- Waltzer L., Perricaudet M., Sergeant A. and Manet E. 1996. Epstein-Barr virus EBNA3A and EBNA3C proteins both repress RBP-J kappa-EBNA2-activated transcription by inhibiting the binding of RBP-J kappa to DNA. *J Virol* 70, 5909-5915.
- Wang F., Gregory C. D., Rowe M., Rickinson A. B., Wang D., Birkenbach M., Kikutani H., Kishimoto T. and Kieff E. 1987. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 specifically induces expression of the B-cell activation antigen CD23. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 3452-3456.
- Wang F., Tsang S. F., Kurilla M. G., Cohen J. I. and Kieff E. 1990. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivates latent membrane protein LMP1. *J Virol* 64, 3407-3416.
- Wang S., Rowe M. and Lundgren E. 1996. Expression of the Epstein Barr virus transforming protein LMP1 causes a rapid and transient stimulation of the Bcl-2 homologue Mcl-1 levels in B-cell lines. *Cancer Res* 56, 4610-4613.
- Weiss L. M., Movahed L. A., Warnke R. A. and Sklar J. 1989. Detection of Epstein-Barr viral genomes in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* 320, 502-506.
- Wheeler K. and Gordon J. 1996. Co-ligation of surface IgM and CD40 on naive B lymphocytes generates a blast population with an ambiguous extrafollicular/germinal centre cell phenotype. *Int Immunol* 8, 815-828.
- Williams S. C., Frippiat J. P., Tomlinson I. M., Ignatovich O., Lefranc M. P. and Winter G. 1996. Sequence and evolution of the human germline V lambda repertoire. *J Mol Biol* 264, 220-232.
- Winberg G., Matskova L., Chen F., Plant P., Rotin D., Gish G., Ingham R., Ernberg I. and Pawson T. 2000. Latent membrane protein 2A of Epstein-Barr virus binds WW domain E3 protein-ubiquitin ligases that ubiquitinate B-cell tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 20, 8526-8535.
- Wu L., Nakano H. and Wu Z. 2006. The C-terminal activating region 2 of the Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 activates NF-kappaB through TRAF6 and TAK1. *J Biol Chem* 281, 2162-2169.
- Wu X., Darce J. R., Chang S. K., Nowakowski G. S. and Jelinek D. F. 2008. Alternative splicing regulates activation-induced cytidine deaminase (AID): Implications for suppression of AID mutagenic activity in normal and malignant B-cells. *Blood*.

- Wysokenski D. A. and Yates J. L. 1989. Multiple EBNA1-binding sites are required to form an EBNA1-dependent enhancer and to activate a minimal replicative origin within oriP of Epstein-Barr virus. *J Virol* 63, 2657-2666.
- Xu J., Foy T. M., Laman J. D., Elliott E. A., Dunn J. J., Waldschmidt T. J., Elsemore J., Noelle R. J. and Flavell R. A. 1994. Mice deficient for the CD40 ligand. *Immunity* 1, 423-431.
- Yalamanchili R., Tong X., Grossman S., Johannsen E., Mosialos G. and Kieff E. 1994. Genetic and biochemical evidence that EBNA 2 interaction with a 63-kDa cellular GTG-binding protein is essential for B lymphocyte growth transformation by EBV. *Virology* 204, 634-641.
- Yates J. L., Camiolo S. M. and Bashaw J. M. 2000. The minimal replicator of Epstein-Barr virus oriP. *J Virol* 74, 4512-4522.
- Yates J. L., Warren N. and Sugden B. 1985. Stable replication of plasmids derived from Epstein-Barr virus in various mammalian cells. *Nature* 313, 812-815.
- Ye B. H., Cattoretti G., Shen Q., Zhang J., Hawe N., de Waard R., Leung C., Nouri-Shirazi M., Orazi A., Chaganti R. S., Rothman P., Stall A. M., Pandolfi P. P. and Dalla-Favera R. 1997. The BCL-6 proto-oncogene controls germinal-centre formation and Th2- type inflammation. *Nat Genet* 16, 161-170.
- Yin Q., McBride J., Fewell C., Lacey M., Wang X., Lin Z., Cameron J. and Flemington E. K. 2008. MicroRNA-155 is an Epstein-Barr virus-induced gene that modulates Epstein-Barr virus-regulated gene expression pathways. *J Virol* 82, 5295-5306.
- Zhang L., Hong K., Zhang J. and Pagano J. S. 2004. Multiple signal transducers and activators of transcription are induced by EBV LMP-1. *Virology* 323, 141-152.
- Zhao B., Maruo S., Cooper A., M R. C., Johannsen E., Kieff E. and Cahir-McFarland E. 2006. RNAs induced by Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 in lymphoblastoid cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 1900-1905.
- Zheng B., Fiumara P., Li Y. V., Georgakis G., Snell V., Younes M., Vauthey J. N., Carbone A. and Younes A. 2003. MEK/ERK pathway is aberrantly active in Hodgkin disease: a signaling pathway shared by CD30, CD40, and RANK that regulates cell proliferation and survival. *Blood* 102, 1019-1027.
- Zimber-Strobl U., Strobl L. J., Meitinger C., Hinrichs R., Sakai T., Furukawa T., Honjo T. and Bornkamm G. W. 1994. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 exerts its transactivating function through interaction with recombination signal binding protein RBP-J kappa, the homologue of Drosophila Suppressor of Hairless. *Embo J* 13, 4973-4982.

7. Anhang

Tabelle A1. Oligonukleotide der PCR-Analysen.

Name des Primers	Sequenz	PCR-Verwendungszweck
V _H 1 ^a	5'-CAG-TCT-GGG-GCT-GAG-GTG-AAG-A-3'	1. und 2. Runde
V _H 2 ^b	5'-GTC-CTR-CGC-TGG-TGA-AAC-CCA-CAC-A-3'	1. und 2. Runde
V _H 3 ^b	5'-GGG-GTC-CCT-GAG-ACT-CTC-CTG-TGC-AG-3'	1. und 2. Runde
V _H 4 ^b	5'-GAC-CCT-GTC-CCT-CAC-CTG-CRC-TGT-C-3'	1. und 2. Runde
V _H 5 ^b	5'-AAA-AAG-CCC-GGG-GAG-TCT-CTG-ARG-A-3'	1. und 2. Runde
V _H 6 ^b	5'-ACC-TGT-GCC-ATC-TCC-GGG-GAC-AGT-G-3'	1. und 2. Runde
V _H 1L ^c	5'-CTC-ACC-ATG-GAC-TGG-ACC-TGG-AG-3'	1. und 2. Runde
V _H 2L ^c	5'-TGC-TCC-ACR-CTC-CTG-CTR-CTG-A-3'	1. und 2. Runde
V _H 3L ^c	5'-ACC-ATG-GAG-TTT-GGG-CTG-AGC-TG-3'	1. und 2. Runde
V _H 3.2L ^c	5'-ACC-ATG-GAA-CTG-GGG-CTC-CGC-TG-3'	1. und 2. Runde
V _H 4L ^c	5'-CTC-CTG-GTG-GCA-GCT-CCC-AGA-T-3'	1. und 2. Runde
V _H 5L ^c	5'-ATC-ATG-GGG-TCA-ACC-GCC-ATC-CT-3'	1. und 2. Runde
3' J _H 1.2.4.5 ^b	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-3'	1. Runde und Einrunden-Protokoll
3' J _H 3 ^b	5'-ACC-TGA-AGA-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-3'	1. Runde und Einrunden-Protokoll
3' J _H 6 ^b	5'-ACC-TGA-GGA-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-3'	1. Runde und Einrunden-Protokoll
5' J _H 1.4.5 ^b	5'-GAC-GGT-GAC-CAG-GGT-KCC-CTG-GCC-3'	2. Runde
5' J _H 2 ^b	5'-GAC-AGT-GAC-CAG-GGT-GCC-ACG-GCC-3'	2. Runde
5' J _H 3 ^b	5'-GAC-GGT-GAC-CAT-TGT-CCC-TTG-GCC-3'	2. Runde
5' J _H 6 ^b	5'-GAC-GGT-GAC-CGT-GGT-CCC-TTK-GCC-3'	2. Runde
V _λ 1 ^d	5'-GGT-CCT-GGG-CCC-AGT-CTG-TG-3'	1. und 2. Runde
V _λ 2 ^d	5'-CAG-TCT-GCC-CTG-ACT-CAG-CCT-3'	1. und 2. Runde
V _λ 3A ^d	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CAG-TGT-CCG-T-3'	1. und 2. Runde
V _λ 3B ^d	5'-CTC-AGC-CAC-CCT-CGG-TGT-CAG-T-3'	1. und 2. Runde
V _λ 4 ^d	5'-TTT-CTT-CTG-AGC-TGA-CTC-AGG-AC-3'	1. und 2. Runde
V _λ 6 ^d	5'-GAG-TCT-CCG-GGG-AAG-ACG-GTA-3'	1. und 2. Runde
V _λ 7 ^d	5'-GTG-GTG-ACT-CAG-GAG-CCC-TCA-C-3'	1. und 2. Runde
V _λ 8 ^d	5'-ACT-GTG-GTG-ACC-CAG-GAG-CCA-3'	1. und 2. Runde
V _λ 9 ^d	5'-GCT-GAC-TCA-GCC-ACC-TTC-TGC-A-3'	1. und 2. Runde
3' J _λ 1 ^d	5'-GCC-ACT-TAC-CTA-GGA-CGG-TGA-C-3'	1. Runde und Einrunden-Protokoll
3' J _λ 2.3 ^d	5'-GAA-GAG-ACT-CAC-CTA-GGA-CGG-TC-3'	1. Runde und Einrunden-Protokoll
3' J _λ 6.7 ^d	5'-GGA-GAC-TYA-CCG-AGG-ACG-GTC-3'	1. Runde und

		Einrunden-Protokoll
5' J _k 1 ^d	5'-GGA-CGG-TGA-CCT-TGG-TCC-CAG-T-3'	2. Runde
5' J _k 2.3.7 ^d	5'-GAC-GGT-CAG-CTT-GGT-SCC-TCC-3'	2. Runde
5' J _k 6 ^d	5'-GAC-GGT-CAC-CTT-GGT-GCC-ACT-3'	2. Runde
V _k 1 ^b	5'-GAC-ATC-CRG-WTG-ACC-CAG-TCT-CCW-TC-3'	1. und 2. Runde
V _k 2 ^b	5'-CAG-WCT-CCA-CTC-TCC-CTG-YCC-GTC-A-3'	1. und 2. Runde
V _k 3 ^b	5'-TTG-TGW-TGA-CRC-AGT-CTC-CAG-SCA-CC-3'	1. und 2. Runde
V _k 4 ^b	5'-AGA-CTC-CCT-GGC-TGT-GTC-TCT-GGG-C-3'	1. und 2. Runde
V _k 5 ^b	5'-CAG-TCT-CCA-GCA-TTC-ATG-TCA-GCG-A-3'	1. und 2. Runde
V _k 6 ^b	5'-TTT-CAG-TCT-GTG-ACT-CCA-AAG-GAG-AA-3'	1. und 2. Runde
V _k 1L ^e	5'-GCT-CAG-CTC-CTG-GGG-CTC-CTG-C-3'	2. Runde
V _k 2L ^e	5'-CTC-AGC-TYC-TGG-GGC-TGC-TAA-TGC-T-3'	2. Runde
V _k 3L ^e	5'-CTC-AGT-TAG-GAC-CCA-GAB-GGA-ACC-AT-3'	2. Runde
V _k 4L ^e	5'-GGG-GCA-GCA-AGA-TGG-TGT-TGC-AGA-3'	2. Runde
3' J _k 1.2.4 ^b	5'-ACT-CAC-GTT-TGA-TYT-CCA-SCT-TGG-TCC-3'	1. Runde und
		Einrunden-Protokoll
3' J _k 3 ^b	5'-GTA-CTT-ACG-TTT-GAT-ATC-CAC-TTT-GGT-CC-3'	1. Runde und
		Einrunden-Protokoll
3' J _k 5 ^b	5'-GCT-TAC-GTT-TAA-TCT-CCA-GTC-GTG-TCC-3'	1. Runde und
		Einrunden-Protokoll
5' J _k 1.2 ^b	5'-TTG-ATY-TCC-ASC-TTG-GTC-CCY-TGG-C-3'	2. Runde
5' J _k 3 ^b	5'-TTG-ATA-TCC-ACT-TTG-GTC-CCA-GGG-C-3'	2. Runde
5' J _k 4 ^b	5'-TTG-ATC-TCC-ACC-TTG-GTC-CCT-CCG-C-3'	2. Runde
5' J _k 5 ^b	5'-TTA-ATC-TCC-AGT-CGT-GTC-CCT-TGG-C-3'	2. Runde
D _H 1 ^f	5'-GTG-TGC-AGG-CCT-CRG-TCT-CTG-TG-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 2 ^f	5'-GCA-CTG-GGC-TCA-GAG-TCC-TCT-C-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 3 ^f	5'-CCT-CAG-GTC-AGC-CCT-GGA-CAT-C-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 4 ^f	5'-TGA-GAT-CCC-CAG-GAC-GCA-GCA-C-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 5 ^f	5'-TCC-CTG-GGA-AGC-TCC-TCC-TGA-C-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 6 ^f	5'-GAC-ACC-AGA-CAG-AGG-GGC-AGG-C-3'	Einrunden-Protokoll
D _H 7-27 ^f	5'-AGA-GTG-ACT-GGC-AGG-GTT-GAG-G-3'	Einrunden-Protokoll
EBNA1F ^f	5'-GGT-CGC-CGG-TGT-GTT-CGT-ATA-TGG-3'	1. und 2. Runde
EBNA1R1 ^f	5'-GCG-GCA-GCC-CCT-TCC-ACC-ATA-G-3'	1. Runde
EBNA1R2 ^f	5'-AGG-GAG-GCA-AAT-CTA-CTC-CAT-CGT-C-3'	2. Runde
EBVF	5'-GAG-CTC-TCC-ACA-ACA-ATG-TTC-CCT-G-3'	1. und 2. Runde
EBVR1	5'-CGG-GGA-ATC-CAC-AGA-CAT-CCG-CTA-3'	1. Runde
EBVR2	5'-GCT-CCC-CTG-TGA-TTA-TTC-CTC-CTA-A-3'	2. Runde und
		Einrunden-Protokoll
C _α F	5'-GCT-ACA-GCG-TGT-CCA-GTG-T-3'	Quantitative RT-PCR
C _α R	5'-GGC-AGC-AGG-TGG-ACC-TC-3'	Quantitative RT-PCR

C _α FAM ^g	5'-ATG-TGT-TTC-CGG-ATT-TTG-3'	Quantitative RT-PCR
C _γ F	5'-CAA-GTG-CAA-GGT-CTC-CAA-CAA-AG-3'	Quantitative RT-PCR
C _γ R	5'-GGC-TGA-CCT-GGT-TCT-TGG-T-3'	Quantitative RT-PCR
C _γ FAM ^g	5'-CAG-CCC-CGA-GAA-CCA-3'	Quantitative RT-PCR
C _λ F	5'-AGC-CAA-CAA-GGC-CAC-ACT-3'	Quantitative RT-PCR
C _λ R	5'-CCT-TCC-AGG-CCA-CTG-TCA-3'	Quantitative RT-PCR
C _λ FAM ^g	5'-TCC-CGG-GTA-GAA-GTC-ACT-3'	Quantitative RT-PCR
J _H <i>Pae</i> ex for ^h	5'-CTT-TAG-AAT-TAT-GAG-GTG-CGC-TGT-GTG-3'	1. Runde
J _H <i>Pae</i> int for ^h	5'-AGA-GAA-CTG-TCG-GAG-TGG-GTG-AA-TC-3'	2. Runde
J _H <i>Mun</i> ex for ^h	5'-GCT-CAG-CTA-AGA-AAT-ACT-AGC-ACA-GTG-3'	1. Runde
J _H <i>Mun</i> int for ^h	5'-GCT-GGA-AGC-AGA-TGA-TGA-ATT-AGA-GTC-3'	2. Runde
J _H <i>Xba</i> ex for ^h	5'-CCT-TGT-CTA-AGT-CAT-TGA-CTG-TAG-GTC-3'	1. Runde
J _H <i>Xba</i> int for ^h	5'-ACC-CTT-GAA-AGT-AGC-CCA-TGC-CTT-C-3'	2. Runde
J _H 6 II ex rev ^h	5'-TGC-AAT-GCT-CAG-GAA-ACC-CCA-CAG-G-3'	1. Runde
J _H 6 II int rev ^h	5'-TAG-CAG-AAA-ACA-AAG-GCC-CTA-GAG-TG-3'	2. Runde
EBER US 1.Rd.	5'-CGG-TGA-CGT-AGT-CTG-TCT-TGA-GG-3'	1. Runde
EBER LS 1.Rd.	5'-GGC-CCT-TAC-ATG-TTG-TGG-GTG-C-3'	1. Runde
EBER1 SP6-US	5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-AAG-CGA-GGA-CCT- ACG-CTG-CCC-TAG-AG-3'	2. Runde
EBER1 T7-LS	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGA-GAA-AAA-CAT- GCG-GAC-CAC-CAG-CTG-G-3'	2. Runde
EBER2 SP6-US	5'-ATT-TAG-GTG-ACA-CTA-TAG-AAG-CGA-GGA-CAG- CCG-TTG-CCC-TAG-TG-3'	2. Runde
EBER1 T7-LS	5'-TAA-TAC-GAC-TCA-CTA-TAG-GGA-GAA-AAA-ATA- GCG-GAC-AAG-CCG-AAT-ACC-3'	2. Runde

^a (Küppers et al., 2002); ^b (Küppers et al., 1993); ^c (Klein et al., 1995); ^d (Bräuninger et al., 1999); ^e (Müschen et al., 2001); ^f (Müschen et al., 2000a); ^g FAM-markierte Sonden; ^h (Schmitz et al., 2005); R = A oder G; Y = C oder T; W = A oder T; S = G oder C; K = G oder T; B = G, C oder T

Tabelle A2: Etablierte GC-LCLs der LD-Klonierungen.

Spender der GC-B-Zellen	Anzahl der monoklonalen GC-LCLs				Anzahl der biklonalen GC-LCLs				Anzahl der oligoklonalen GC-LCLs			
	Zellen/Fach				Zellen/Fach				Zellen/Fach			
	10	50	10 ²	10 ³	10	50	10 ²	10 ³	10	50	10 ²	10 ³
A	na	na	na	15	na	na	na	5	na	na	na	4
B	na	na	na	7	na	na	na	4	na	na	na	0
C	na	5	18	0	na	1	4	0	na	0	3	0
D	5	27	10	na	1	12	17	na	0	4	7	na

na: Zellverdünnungen, die bei dem jeweiligen Spender nicht angewandt wurden.

Tabelle A3: V_H-Genverbindungen der 103 monoklonalen GC-LCLs.

Spender	GC-LCL	V _H -Gen- umordnung	Mutations- Frequenz	Funktionalität	D _H J _H -Gen- umordnung	BCR- Ausprägung
A	4-4	V _H 3-33	5,1	+	D _H 2-2/J _H 6b	+
	4-7	V _H 4-59	1,0	+	D _H 2-2/J _H 5b	+
	4-8	V _H 3-74	4,1	+	-	-
		V _H 3-23	3,5-3,9	+		
	4-16	V _H 3-9	0,5	+	-	-
		V _H 4-4	0,5	-		
	4-17 ^a	V _H 3-48	6	-	D _H 2-2/J _H 6b	-
	4-18	V _H 2-5	2,1	+	-	+
		V _H 3-9	2,5	-		
	4-19	V _H 3-9	0,4	+	D _H 3-9/J _H 6b	+
	4-21	V _H 3-9	6,7	+	D _H 2-15/J _H 6b	-
	4-22	V _H 3-33	2,1	+	-	-
	4-23	V _H 3-15	5,1	+	D _H 2-2 J _H 6b	+
	4-24	V _H 3-33	1,9	+	D _H 5-24/J _H 4b	-
	4-25	V _H 1-24	0,9	+	-	+
		V _H 3-9	2,6	-		
	4-26	V _H 3-23	0	+	D _H 2-2/J _H 6b	-
	4-27	V _H 3-23	1,5	+	D _H 1-26/J _H 3b	+
	4-29	V _H 4-4	6,1	+	D _H 1-26/J _H 3b	-
B	5-2-2	V _H 3-48	4,1	+	D _H 4-4/ J _H 6b	+
	5-5-1	V _H 4-59	4,2	+	-	-
		V _H 3-64	2,3	-		
	5-7-1 ^a	V _H 4-59	1,4	-	D _H 2-2/ J _H 6c	-
	5-7-2	V _H 3-30	0,8	+	D _H 2-2/ J _H 6c	+
	5-12-1	V _H 4-59	3,1	+	D _H 1-26/J _H 3	-
	5-13-4	V _H 3-66	3,7	+	D _H 4-23/J _H 4	-
	5-17-3	V _H 1-2	5,3	+	D _H 5-12/J _H 5	-
	5-B1	V _H 3-30	0	+	D _H 3-10/J _H 5	+
	5-B2	V _H 3-30	1,6	+	D _H 2-15/J _H 4	+
	5-B3	V _H 4-39	3,1	+	D _H 3-3/J _H 6	-
	5-B4	V _H 3-7	2,2	+	-	-
		V _H 4-4	2,6	-		
	5-B5	V _H 3-66	4,0	-	-	+
		V _H 4-39	3,6	+		
	5-B8	V _H 4-34	13,3	+	D _H 4-23/J _H 4	+
	5-B12	V _H 3-74	2,0	-	-	+
		V _H 4-59	1,5	+		
	5-B13	V _H 4-59	2,0	+	D _H 2-15/ J _H 6	+
	5-B15	V _H 5-51	2,7	+	D _H 2-2/J _H 4	-
	5-B25	V _H 4-59	3,6	+	na	+
	5-B26	V _H 3-48	5,2	+	-	+
		V _H 3-49	5,8	-		
	5-B29	V _H 4-59	7,5	+	na	-
	5-B30	V _H 4-61	3,5	+	D _H 5-24/J _H 2	+
	5-B32	V _H 3-11	2,0	+	na	+
	5-B34	V _H 4-39	3,4	+	na	-
	5-B40	V _H 3-23	4,5	+	D _H 6-5/J _H 4b	+
	5-B43	V _H 3-23	1,5	+	na	+
C	6-1	V _H 3-9	8,2	+	D _H 5-12/J _H 4	+
	6-2	V _H 1-46	4,8	+	D _H 3-3/J _H 4	+
	6-3	V _H 3-15	0,7	+	D _H 2-2/J _H 4	-
	6-8	V _H 1-8	2,2	+	D _H 3-21/J _H 5	-
	6-11	V _H 3-9	4,7	+	D _H 2-2/J _H 6c	+
	6-13	V _H 4-39	5,2	+	D _H 3-3/J _H 4	-
	6-14	V _H 1-8/J _H 3P	3,4	-	-	-
		V _H 3-30	3,5	+		

	6-15	V _H 1-2	0,9	+	D _H 2-21/ J _H 3b	+
	6-16	V _H 1-46	2,8	-	-	+
		V _H 3-30	1,5	+		
	6-17	V _H 3-23	3,5	+	D _H 1-20/J _H 4	+
	6-18	V _H 4-30	15,5	+	D _H 2-2/J _H 4	-
	6-21	V _H 2-5	4,1	+	D _H 5-12/ J _H 3b	+
	6-22	V _H 3-11	7,7	+	D _H 4-23/J _H 4	-
	6-23 ^b	V _H 1-2	>8,0	-	-	-
		V _H 3-30	8,0	+		
	6-24	V _H 3-15	1,9	+	D _H 5-24/J _H 4	-
	6-25	V _H 4-30	7,1	+	D _H 3-9/J _H 5b	+
	6-26	V _H 4-59	4,6	+	D _H 6-5/ J _H 1	+
	6-28	V _H 3-21	6,7	+	D _H 2-2/ J _H 6	-
	6-32	V _H 3-30	1,3	+	D _H 1-26/ J _H 4	+
	6-44	V _H 3-30	9,2	+	-	+
		V _H 4-34	11,5	-		
	6-47	V _H 4-34	12,8	+	D _H 5-24/J _H 3	-
	6-48	V _H 4-31	6,9	+	D _H 3-3/J _H 3	+
	6-49 ^c	V _H 1-24	5,1	+	D _H 1-20/J _H	-
D	7-2	V _H 2-5	5,8	+	D _H 2-2/ J _H 5b	+
	7-3	V _H 3-30	0	+	na	+
	7-4	V _H 2-26	1,5	+	-	-
		V _H 3-15	2,3	-		
	7-5	V _H 4-4	2,1	+	na	-
	7-9	V _H 3-30	3,0	+	na	-
	7-10	V _H 3-23	9,0	+	na	-
	7-13	V _H 3-30	1,5	-	-	+
		V _H 4-39	3,5	+		
	7-18	V _H 1-8	2,4	-	-	+
		V _H 3-23	2,1	+		
	7-22	V _H 3-15	12,8	-	-	+
		V _H 4-34	5,4	+		
	7-23	V _H 3-15	2,0	+	na	+
	7-26	V _H 3-23	3,8	+	na	+
	7-36 ^d	V _H 3-23	2,1	+	D _H 2-2/ J _H 4b	-
	7-38	V _H 3-64	5,6	+	na	-
	7-43	V _H 5-51	1,9	+	na	+
	7-49	V _H 3-9	3,4	+	na	+
	7-54	V _H 3-30	2,0	+	na	+
	7-63	V _H 4-61	3,3	+	na	+
	7-64	V _H 3-74	4,8	-	-	-
		V _H 4-31	2,8	+		
	7-67	V _H 2-70	1,3	+	na	-
	7-68	V _H 1-2	0	-	na	+
		V _H 4-59	0	+		
	7-69	V _H 4-39	0,9	+	na	-
	7-75	V _H 3-15	0	+	na	-
	7-81	V _H 3-30	10,0	+	na	+
	7-82	V _H 3-9	3,8	+	na	-
	7-83 ^e	V _H 3-30	0	-	-	+
	7-84	V _H 3-23	2,0	+	na	-
	7-85 ^a	V _H 3-48	1,0	-	J _H 3/ D _H 3-23/J _H 5	-
	7-86	V _H 3-74	3,2	+	na	+
	7-87	V _H 3-66	5,6	+	na	-
	7-89	V _H 3-74	3,4	+	-	+
	7-93	V _H 3-11	3,7	+	-	+
		V _H 4-34	12,9	-		
	7-94	V _H 1-18	7,3	+	na	+
	7-95	V _H 3-30	0	+	na	+
	7-96	V _H 3-30	1,6	+	na	-
	7-97	V _H 3-23	0	+	na	+
	7-100	V _H 1-69	7,0	+	na	+

7-101	V _H 3-23	0	+	na	+
7-104	V _H 2-5	1,1	+	-	-
	V _H 3-30	1,5	+		
7-106 ^f	V _H 1 biklonal	na	+	na	+
7-146	V _H 3-21	7,5	+	na	+
7-148	V _H 1-18	2,4	+	na	-

Bei den nicht-monoklonalen GC-LCLs wurden nicht immer alle Allele detektiert. ^a BCR-verkrüppelte GC-LCLs. ^b Aufgrund von zu vielen Deletionen und Punktmutationen, lässt sich die Mutationsfrequenz des nicht-funktionellen Allels nicht genau bestimmen. ^c Die D_HJ_H-Genumlagerung dieser LCL hat zu viele Nukleotide am 5'J_H-Ende verloren, eine eindeutige Bestimmung des J_H-Gens ist nicht mehr möglich. ^d Potentiell BCR-verkrüppelte GC-LCL; ^e Diese GC-LCL hat eine V_H-Genumordnung, die nicht im Leseraster ist. Das 2. Allel dieser GC-LCL konnte nicht identifiziert werden. ^f Ein Allel ist im Leseraster, jedoch konnte aufgrund der Biklonalität keine Gen-Zuordnung stattfinden. na steht für nicht analysiert.

Tabelle A4: V_L-Genverbindungen der Oberflächen Ig-negativen GC-LCLs.

Spender	GC-LCL	V _L -Genumordnung	Mutations-Frequenz	Funktionalität
A	4-8	V _κ 1D-33	2,1	-
		V _λ 3-21	1,7	+
	4-16	V _κ 1-13	0,6	+
	4-17 ^a	V _κ 1-5	2,0	+
	4-21	V _λ 3-1	1,3	+
	4-22	V _κ 2-30 ^b	0	nb
		V _κ 3-20	0	-
	4-24	V _λ 2-14	1,8	+
		V _κ 2-30 ^b	1,0	nb
		V _λ 2-14	0,5	+
	4-26	V _κ 1-16	0	+
		V _λ 2-23	0,5	+
	4-29	V _κ 2-30	0	+
		V _λ 3-21	5,3	+
B	5-5-1	V _κ 1-37	0	-
		V _κ 3-15	0,3	+
	5-7-1 ^a	V _κ 1-39	0	-
		V _κ 3-15	1,0	+
	5-12-1	V _κ 3-15	0,4	+
		V _κ 4-1	0	+
		V _λ 1-40	2,0	-
		V _λ 3-12	0	+
	5-13-4	V _κ 1-12	1,8	-
		V _λ 2-14	2,9	+
	5-17-3	V _κ 1-39	6,5	-
		V _κ 3-20	2,1	+
	5-B3	V _κ 1-39	0	-
		V _κ 2-30 ^b	1,2	nb
		V _λ 1-47	1,8	+
		V _λ 8-61	1,7	-
	5-B4	V _κ 1-39	2,8	-
		V _λ 2-11	2,9	+
	5-B15	V _κ 1-13	0,5	+
	5-B29	V _κ 1-39	3,5	+
	5-B34	V _κ 3-20	0	+

C	6-3	V _κ 1-39	0	-
		V _κ 3-20	0	-
		V _λ 1-44	0,3	+
		V _λ 2-11	2,5	+
	6-8	V _κ 3-20	0,7	+
	6-13	V _κ 1-27	1,7	+
	6-14	V _κ 1-37	0	-
		V _λ 2-11	2,0	+
	6-18	V _κ 1-8	1,5	+
		V _κ 4-1	0	-
		V _λ 2-11	0	+
	6-22	V _κ 3-11	2,0	+
	6-23	V _κ 1-39	0,2	-
		V _λ 3-21	6,5	+
	6-24	V _κ 1-5	1,7	+
		V _κ 4-1	2,2	-
		V _κ 1-39	8,0	+
	6-47	V _κ 1-39	0	-
		V _λ 2-23	12,2	+
	6-49	V _κ 3-20	1,2	+
D	7-4	V _λ 2-23	5,0	-
		V _λ 3-21	2,9	+
	7-5	V _λ 3-25	1,3	+
	7-9	V _λ 3-21	4,2	+
	7-10	V _λ 3-51	5,0	+
	7-36	V _λ 2-18	0,8	+
	7-38	V _λ 2-23	5,4	+
	7-64	V _λ 1-51	1,1	+
	7-67	V _λ 1-51	0,7	+
	7-69	V _λ 1-47	0	+
	7-75	V _λ 3 biklonal	nb	nb
	7-82	V _κ 2-30	2,8	+
	7-84	V _κ 1-16	1,0	-
		V _κ 3-20	1,0	+
	7-85 ^a	V _κ 2-D40	0	-
		V _κ 3-20	0	-
		V _λ 1-47	0	+
		V _κ 1-D43	0	+
	7-87	V _λ 3-21	0	+
		V _λ 3-21	0,4	+
	7-104	V _κ 1-27	0	+
		V _κ 2-30 ^b	0	nb
		V _λ 1	nb	+
		V _λ 1	nb	-
	7-148	V _λ 2-23	2,2	+

nb steht für nicht bestimmt; ^a diese GC-LCLs tragen BCR-verkrüppelte V_HD_HJ_H-Genverbindungen; ^b die Funktionalität der V_κ2-30-Genverbindungen konnte, aufgrund eines sehr langen Introns in der Leitpeptidsequenz und der damit verbundenen schlechter lesbaren Sequenz, nicht immer bestimmt werden.

Tabelle A5: Original MFIs ausgewählter Oberflächen-Marker in monoklonalen LCLs und primären B-Zellpopulationen.

Zellen/ Zelllinien		CD20	CD27	CD30 (% der Zellen)	CD38	CD77	CD79b
Primäre GC-B-Zellen		34401	6605	30	21757	6008	1560
Ig-verkrüppelte GC-LCL	4-17	6120	1293	8517	3514	1280	44
	5-7-1	585	121	29635	2187	141 ^{a (259)}	0
	7-85	1028	244	340 (34) 20933 (66)	18573	278	146 ^{a (132)}
sIg-negative GC-LCL	5-5-1	3589	386	5150 (22) 28763 (78)	14376	290	355
	5-B4	8151	63	17657	2463	751	146
	6-28	5198	1385	26082	5348	146 ^{a (115)}	0
sIg-positive GC-LCL	5-2-2	1079	296	6027 (16) 30403 (84)	11159	92	435
	5-B8	2135	653	4456 (13) 48820 (87)	10378	138 ^{a (109)}	182
	6-16	1203	345	744 (18) 22993 (82)	19523	116 ^{a (104)}	574
Primäre naive B-Zellen		2927	74	27	1212	93	6252
N-LCL	B1-18	8770	227	5999 (11) 22578 (89)	13081	998	882
	B1-40	8590	125	322 (63) 9607 (37)	40847	364	467
	B1-59	10723	624	111 (7) 9256 (93)	14181	303	304

Mittlere Fluoreszenz-Intensitäten (MFI) minus die Auto-Fluoreszenzen der individuellen Zelllinien. ^a Die Färbung dieser Linien für die jeweiligen Marker zeigen eine MFI minus die Auto-Fluoreszenz zwischen 100 und 1000, jedoch ähnlich der entsprechenden Isotyp-Kontrollen. Die Linien sind daher für diesen Marker negativ. Die MFI der Isotyp-Kontrollen sind zum Vergleich kursiv in Klammern hinzugefügt.

Tabelle A6: Sequenzen einzelner EBV⁺ B-Zellen aus dem PB von drei Blutspendern.

Spender	Zelle	V _H -Gen- umordnung	Mutations- Frequenz	V _H -Gen- umordnung	Mutations- Frequenz
A ^a	1			V _λ 1-47 if	5,9
	8	V _H 4-59 if	3,3		
	13	V _H 3-30 if	6,1		
	30			V _λ 1-47 nf	1,4
	35 ^c	V _H 2-5 if	0		
	41 ^c			V _λ 1-44 if	0
	72 ^c			V _λ 2-8 oof	0
				V _λ 3-1 if	0
	87 ^c	V _H 2-5 if	0		
	89 ^c			V _λ 2-8 if	0
	90	V _H 4-59 if	5,7		
	95 ^c	V _H 1-24 if	0	V _λ 3-10 if	0
		V _H 4-34 if	0		
	100			V _λ 2-14 if	5,2
	101			V _κ 3-11 if	4,3
	102			V _κ 2-D40 if	0
	104	V _H 4-34 if	4,8		
	126			V _κ 2-D28 if	0
	136			V _λ 3-19 if	4,2
	175			V _κ 3-11 oof	0
	191			V _κ 2-D28 if	0
	195	V _H 3-23 if	1,8		
	199			V _κ 1-27 if	4,3
	200			V _κ 2-30 oof	0
	201			V _λ 2-14 if	2,0
	217			V _λ 2-14 if	5,7
	- Kontrolle 20			V _κ 1-D39 oof	0
B ^a	21	V _H 3-23 if	12,8		
	27 ^d			V _λ 3-21 if	10,7
	49			V _κ 1-D39 if	0
	58 ^e	V _H 3-43 if	11,6	V _λ 1-40 if	1,8
	62	V _H 1-2 if	2,9	V _λ 3-1 if	2,0
				V _κ 4-1 oof	0
	66 ^d			V _λ 3-21 if	11,2
				V _κ 1-16 oof	0,9
	68 ^e			V _λ 1-40 if	1,8
	69 ^c	V _H 4-34 if	0		
	71 ^e			V _λ 1-40 if	2,1
	77 ^c			V _λ 2-11 if	0
	79 ^c			V _λ 3-1 if	0
	82 ^d			V _κ 1-16 oof	1,3
	96	V _H 4-61 if	5,4		
	99	V _H 5-a3 if	14,3	V _κ 1-D39 if	0
	123			V _λ 1-44 if	2,9
	132	V _H 1-3 if	6,0		
	161			V _λ 6-57 if	2,4
	162 ^e			V _λ 1-40 if	1,8
	166 ^d			V _λ 3-21 if	10,7
	171			V _κ 1-D39 oof	0,9
	177			V _κ 2-29 oof	0
	178			V _λ 3-21 if	7,6
	- Kontrolle 8 ^c			V _λ 1-47 oof	0

C ^a	1	V _H 2-5 if	8,3	V _λ 2-11 if	10,2
	6	V _H 3-21 if	5,5	V _κ 1-33 nb	0
				V _κ 1-39 nb	0
	7			V _κ 3-15 if	0,9
	13			V _λ 3-21 if	7,2
	14			V _λ 3-21 if	3,8
				V _κ 1-D16 oof	0
	15			V _κ 3-15 nf	0,7
				V _κ 1-39 oof	0
	18 ^c	V _H 1-3 if	0	V _κ 1-5 if	0
	22	V _H 1-69 if	13,1	V _κ 3-20 if	8,9
		V _H 3-30 if	7,2		
	26			V _κ 1-D12 oof	10,0
	28			V _κ 1-39 if	3,0
	34	V _H 3-30 if	7,9	V _κ 3-20 if	6,5
	36			V _λ 3-25 if	10,1
	41	V _H 3-30 if	10,6		
	42			V _κ 1-39 oof	0
C ^b	1			V _κ 2-29 oof	0
				V _κ 4-1 oof	0
	16	V _H 4-39 if	4,3		
	17	V _H 3-30 if	4,3	V _λ 3-21 if	3,5
	21	V _H 3-9 if	10,6	V _λ 1-51 if	8,0
	24 ^f	V _H 4-59 if	4,1		

^a Zellen wurden hydraulisch mikrodisektiert; ^b Zellen wurden mit dem Laser mikrodisektiert; ^c Zellen mit unmutierten V-Genumordnungen; ^d und ^e Zellen sind jeweils klonal verwandt; ^f Zelle mit BCR-verkrüppelter V_H-Genumordnung; if entspricht im Leseraster (engl. in-frame), oof entspricht aus dem Leseraster (engl. out-of-frame), nb entspricht nicht bekannt, nf entspricht nicht funktionell.

8. Danksagung

Ein herzliches Dankeschön vor allem an Prof. Dr. Ralf Küppers für die hervorragende Betreuung meiner Doktorarbeit und die stetige Diskussionsbereitschaft.

Für ihre vielfältige Unterstützung danke ich ausserdem: Kerstin Heise, Gwen Lorenz, Andrea Kopplin und Katherina Waldhelm. Der gesamten Arbeitsgruppe Küppers danke ich für eine gute Zeit.

Ausserdem möchte ich mich bei unserer Kooperationsgruppe von der Pathologie des Universitätsklinikums Frankfurt (M) und des Universitätsklinikums Münster für die herausragende Zusammenarbeit bedanken. Hierbei gilt mein ausdrücklicher Dank Prof. Dr. Martin-Leo Hansmann, Prof. Dr. Andreas Bräuninger und Sabine Albrecht.

Für die gute Kooperation und Bereitstellung der Tonsillen bedanke ich mich bei Dr. Claus Unkel, Dr. Götz Lehnerdt und Prof. Dr. Stephan Lang von der Hals-Nasen-Ohren Klinik des Universitätsklinikums Essen.

Ein Dankeschön auch an Prof. Dr. George Klein und Prof. Dr. Gerald Niedobitek für die Bereitstellung der LCLs IMEBV, 031006, 030515 und 940410 aus dem PB zur quantitativen RT-PCR Analyse der Ig-Transkripte, an Dr. Alexander Scheffold für die magneto-fluoreszenten Liposomen sowie an Dr. Elisabeth Kremmer für den LMP2A- und Dr. Berit Jungnickel für den AID-AK.